Renata Moscolini Romão

**Desenvolvimento de um teste para a
trissomia do cromossomo
21 através da análise de ácidos nucleicos
fetais no plasma materno por
sequenciamento de última geração**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Henrique
Burlacchini de Carvalho

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Romão, Renata Moscolini

Desenvolvimento de um teste para a trissomia do cromossomo 21 através da análise de ácidos nucleicos fetais no plasma materno por sequenciamento de última geração / Renata Moscolini Romão. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Mário Henrique Burlacchini de Carvalho.

Descritores: 1.Diagnóstico pré-natal/métodos 2.Síndrome de Down 3.Plasma
4.DNA/sangue 5.Cromossomos humanos par 21 6.Líquido amniótico 7.Feto

USP/FM/DBD-155/16

***“Wisdom is to have dreams that are big enough not to lose
sight when we pursue them”***

Oscar Wilde

Agradecimentos

Ao **Departamento de Obstetrícia**, em especial ao **Prof. Dr. Marcelo Zugaib**, por permitir a realização deste trabalho em seu departamento.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Mario Henrique Burlacchini de Carvalho**, pela confiança, incentivo, apoio, paciência e ensinamentos.

Ao **Dr. José Eduardo Levi**, por me aceitar quando fui bater na porta do laboratório de Virologia do IMT-USP, por acreditar no projeto e não desistir após as recusas iniciais, e, sem o qual, este trabalho não teria sido realizado. Obrigada por todo apoio, dedicação, incentivo e ensinamentos.

Ao **Dr. Cláudio Sérgio Pannuti**, diretor do Instituto de Medicina Tropical, por abrir todas as portas para que esse trabalho pudesse ser realizado no Laboratório de Virologia do IMT-USP. Agradeço a confiança e a oportunidade de colaborar em projetos desse laboratório.

Aos membros da minha banca de qualificação – **Prof. Dr. Adolfo Wenjaw Liao**, **Prof^a. Dra. Rossana Pulcineli Vieira Francisco** e **Dr. Silvio Martinelli** – pela valiosa contribuição e pela disponibilidade.

Cristiane Centrone, Rodrigo Pessoa, Clara Felix, Michele Padovan, Sabri e Cristina Oliveira

A **Renata Wendel, Karen Chinoca e Ana Paula** por compartilharem comigo os mesmos temas, orientadores, laboratórios, departamentos e dificuldades.

A todos os colegas do laboratório de Virologia – **Paulinho, Luiz, Feipe, Matáia, Felipe, Célia Luiza, Ana Carolina Mamana, Luciana, Toni, Carol Soares, Camila Romano Cris Fink, Laurinha, Cínthia, Tânia, Luci, Marli, Silvia Helena** – pela contribuição, por dividirem momentos do cotidiano e pelas incansáveis risadas.

A todo pessoal da **enfermagem da Clínica Obstétrica**, em especial a **Josefa**, pela ajuda com a coleta das amostras das gestantes.

Ao **Amadeu**, pelas inúmeras ligações me avisando da realização de procedimentos

A todos as **gestantes** que, mesmo em momentos de angústia durante suas gestações, literalmente deram seu sangue para este projeto, e sem o qual, não poderia ser realizado.

Aos funcionários do laboratório de Virologia - **Luciano, Débora, Sônia, Georgina e Maria** por sempre estarem prontos pra ajudar quando precisei

A todos os **médicos assistentes e residentes** da clínica obstétrica pela colaboração com a coleta das amostras de líquido amniótico do projeto.

Aos funcionários da **secretaria e da Informática do Departamento de Obstetrícia** por todo apoio prestado.

Às pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho, e com meu desenvolvimento científico e intelectual, minha sincera gratidão.

À **FAPESP**, pelo auxílio pesquisa e à CAPES pela bolsa de doutorado concedidos.

Aos meus maiores e mais queridos **amigos, Laura, Francile, Ana Luiza, Débora, Lucas, Gui, Karina e Monique**, que, de perto ou de longe, são de extrema importância para minha vida e me dão sempre todo o apoio que preciso! A todo pessoal de Santos. À uma pessoa muito especial, **Gustavo**, que entrou recentemente na minha vida, da maneira mais inesperada possível, e que não quero deixar sair mais!

E finalmente, à minha **família**, toda ela! Sobretudo à minha querida irmãzinha **Patrícia**, pela amizade e companheirismo. Ao meu cunhado **Rafa** pela amizade e por cuidar tão bem da minha irmãzinha. Às minhas tias **Magda, Sandra e Ana**, ao meu tio **Luiz**, aos meus primos **Rafael, Thiago, Karina e Lucas**, a minha avó **Dalva** por serem partes essenciais do meu dia a dia.

Um agradecimento saudoso e com muito carinho aos meus avós mais queridos, **Luzia e Dario**. No dia da minha defesa de mestrado perdi minha avozinha, dois anos depois perdi o meu avozinho. Vocês foram as pessoas mais bondosas, batalhadoras e vencedoras que já conheci na vida. Como vocês fazem falta!

Um agradecimento em especial aos meus **pais**, que tanto admiro e que são a base da minha vida. À minha mãe **Celi**, pelo apoio, carinho e amor incondicional. Ao meu pai **João**, por sempre incentivar a pesquisa, por se interessar por cada detalhe de meu trabalho, e por todo seu amor. Sei que vocês torceram, vibraram e se orgulharam a cada conquista!

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Resumo

Summary

Agradecimentos 4

Resumo 18

Summary 19

1. Introdução..... 1

2. Objetivos 7

3. Revisão de Literatura 8

3.1 Investigação da síndrome de Down durante a gestação 8

3.2 Ácidos nucleicos livres na circulação sanguínea 10

3.3 Metodologias utilizadas para detecção não invasiva de aneuploidias
fetais..... 16

3.3.1 Sequenciamento *Shotgun* 20

3.3.2 Sequenciamento alvo 23

3.3.3 Sequenciamento Seletivo de SNPs 24

3.4 A fração fetal do total de ácidos nucleicos circulantes no sangue materno	26
4. Casuística e Métodos	28
4.1 Casuística	28
4.1.1 Critérios de Inclusão:.....	28
4.1.2 Critérios de Exclusão:.....	28
4.2 Métodos	30
4.2.1 Extração de DNA fetal Livre de líquido amniótico para Padronização da Reação de Sequenciamento dos <i>Amplicons</i>	30
4.2.2 Determinação da concentração e pureza do DNA	31
4.2.3 Desenho dos <i>primers</i> para PCR de <i>Amplicons</i> de líquido amniótico	32
4.2.4 Sequenciamento dos <i>Amplicons</i> de Líquido amniótico no Ion Torrent.....	32
4.2.5 Extração de DNA livre fetal de Plasma de Gestante	36
5. Resultados	38
5.1 Coleta das amostras	38
5.2 Extração e Determinação da Concentração de DNA fetal de líquido amniótico	39
5.3 Desenho dos <i>primers</i> e padronização da reação de amplificação de fragmentos dos genes <i>PLAC4</i> e <i>C21orf105</i> de líquido amniótico	40

5.4 Sequenciamento dos <i>Amplicons</i> de Líquido amniótico no Ion Torrent	47
5.5 Extração e Determinação da Concentração de DNA fetal de Plasma de Gestante	51
5.6 Amplificação dos fragmentos dos genes PLAC4 e C21orf105 de DNA livre de plasma de gestantes.....	53
5.7 Sequenciamento dos <i>Amplicons</i> de Plasma de Gestante no Ion Torrent	57
6. Discussão	65
7. Conclusão.....	70
8. Anexos.....	71
8.1 Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)..	71
8.2 Anexo 2 - Aprovação CAPPesq	74
8.3 Anexo 3 – Aprovação CEP IMT-USP	75
9. Referências Bibliográficas	76

Lista de Figuras

Figura 1. Gel de agarose 2% da PCR feita com gradiente de temperatura de anelamento do fragmento definido pelo par de <i>primers</i> 1, de 144 pares de bases	44
Figura 2. Gel de agarose 2% da PCR feita com gradiente de temperatura de anelamento do fragmento definido pelo par de <i>primers</i> 2, de 115 pares de bases	44
Figura 3. Gel de agarose 2% da PCR feita com gradiente de temperatura de anelamento do fragmento definido pelo par de <i>primers</i> 4, de 117 pares de bases	44
Figura 4. Gel de agarose 2% da PCR feita com gradiente de temperatura de anelamento do fragmento definido pelo par de <i>primers</i> 5, de 148 pares de bases	45
Figura 5. Gel de agarose 2% da PCR feita com gradiente de temperatura de anelamento do fragmento definido pelo par de <i>primers</i> 6, de 107 pares de bases	45
Figura 6. Gel de agarose 2% da PCR feita com gradiente de temperatura de anelamento do fragmento definido pelo par de <i>primers</i> 9, de 178 pares de bases	45
Figura 7. Gel de agarose 2% dos produtos de PCR com 20 ng/ μ L de DNA e temperatura de anelamento de 58 °C.....	46
Figura 8. Gel de agarose 2% dos produtos de PCR com 5 ng/ μ L de DNA e temperatura de anelamento de 58 °C.....	46

Figura 9. Exemplo do *report* de uma corrida feita com 16 amostras de DNA de líquido amniótico, mostrando o carregamento do chip, o número total de *reads*, número de *reads* usáveis, e a média do comprimento dos fragmentos sequenciados..... 49

Figura 10. Gel de agarose 2% da PCR feita com as amostras de DNA 47 e 50 mostrando a amplificação dos fragmentos 1 (144 pb), 2 (115 pb), 3 (178 pb), 4 (117 pb), 5 (148 pb), 6 (107 pb) e 9 (178 pb) 56

Figura 11. Exemplo do *report* de uma corrida feita com 22 amostras de DNA de plasma de gestante, mostrando o carregamento do chip, o número total de *reads*, número de *reads* usáveis, e a média do comprimento dos fragmentos sequenciados..... 58

Lista de Tabelas

Tabela 1. Resultados do cariótipo das amostras coletadas para o projeto ..	38
Tabela 2. Resultado do cariótipo e idade gestacional das amostras de líquido amniótico.....	39
Tabela 3. Descrição dos pares de <i>primers</i> desenhados para o sequenciamento de <i>amplicons</i> de líquido amniótico no Ion Torrent.....	42
Tabela 4. Tabela com resultados das frequências de cada alelo dos SNPs sequenciados para as amostras (o alelo A está representado pela barra verde, o C pela barra azul, o G pela barra preta e o T pela barra vermelha)	49
Tabela 5. Distribuição das médias das razões das quantidades de <i>reads</i> dos SNPs informativos das amostras normais e das amostras com trissomia do cromossomo 21 (T21)	51
Tabela 6. Resultado do cariótipo e idade gestacional das amostras de plasma de gestante.....	52
Tabela 7. Descrição dos pares de <i>primers</i> desenhados para o sequenciamento de <i>amplicons</i> de plasma de gestante no Ion Torrent.....	54
Tabela 8. Estimativa da proporção de cada alelo do SNP para todas as combinações possíveis de genótipos materno e fetal para dado SNP, levando em conta a fração fetal de 10%.....	59
Tabela 9. Estimativa da proporção de cada alelo do SNP para todas as combinações possíveis de genótipos materno e fetal para dado SNP, levando em conta a fração fetal de 5%.....	60

Tabela 10. Resultados da porcentagem de *reads* encontrada para cada alelo dos SNPs dos fragmentos 1, 2 e 3, mostrando o gene, fragmento, nome do SNP e posição do SNP 61

Tabela 11. Resultados da porcentagem de *reads* encontrada para cada alelo dos SNPs dos fragmentos 4, 5, 6 e 9, mostrando o gene, fragmento, nome do SNP e posição do SNP 62

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

%: percentagem

°C: Graus Celsius

β-hCG: subunidade β da gonadotrofina coriônica humana

μL: microlitro

μg: micrograma

a: amperes

A: nucleotídeo adenina

C: nucleotídeo citosina

C21orf105: nome do gene em inglês *Chromosome21 Open Reading Frame 105*

CAPPesq: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

DNA: ácido desoxirribonucleico

dATP: deoxinucleotídeo trifosfato A

dCTP: deoxinucleotídeo trifosfato C

dGTP: deoxinucleotídeo trifosfato G

dTTP: deoxinucleotídeo trifosfato T

dNTP: deoxinucleotídeo trifosfato

DSCR4: região crítica da síndrome de Down 4 (*Down Syndr. Critical Region4*)

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

FCAPS: *fetal copy number analysis through maternal plasma sequencing*

G: nucleotídeo guanina

GC: guanosina-citosina

H⁺: íon hidrogênio com carga positiva

HC-FMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HCl: cloreto de hidrogênio

HLCS: nome do gene em inglês *holocarboxylase synthetase*

IMT-USP: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo

KCl: cloreto de potássio

LOESS: *locally weighted scatterplot smoothing*

Mb: megabase

MgCl₂: cloreto de magnésio

mL: mililitro

mM: milimolar

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

N °: número

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

ng: nanograma

PAPP-A: proteína plasmática A associada à gestação

pb: pares de bases

pH: potencial hidrogênico

PCR: reação em cadeia da polimerase

PLAC4: nome do gene em inglês *Placenta-Specific 4*

Pmol: picomol

qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa

RASSF1A: nome do gene em inglês *Ras association domain family member 1*

RhD: antígeno Rhesus D

RNA: ácido ribonucleico

RNase: ribonuclease

RT-MLPA: *reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification*

SERPINB2: nome do gene em inglês *serpin peptidase inhibitor, clade B (ovoalbumin), member2*

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism*)

T: nucleotídeo timina

TAE: tris acetato EDTA

Tm: temperatura de anelamento (*melting*)

U: unidade

USP: Universidade de São Paulo

V: volts

Resumo

Romão RM. *Desenvolvimento de um teste para a trissomia do cromossomo 21 através da análise de ácidos nucleicos fetais no plasma materno por sequenciamento de última geração* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de um teste não invasivo para a trissomia do cromossomo 21 através da análise de ácidos nucleicos fetais livres no plasma materno por sequenciamento de última geração realizado no sequenciador automático Ion Torrent. A metodologia proposta para o teste é a análise de SNPs com alta taxa de heterozigosidade na população brasileira localizados em dois genes presentes no cromossomo 21 (PLAC4 e C21orf105), e a detecção da cópia extra do cromossomo 21 é feita pela razão dos alelos desses SNPs, sendo que a razão de 1:1 indica que o feto é normal, e a razão de 2:1 indica que o feto tem uma cópia extra do cromossomo 21. Para a validação da metodologia foram utilizadas 50 amostras de DNA livre extraídas de líquido amniótico, previamente caracterizadas por análise citogenética consideradas como o padrão ouro pois contém apenas material genético fetal abundante. A metodologia foi validada com sucesso nessas amostras, sendo que as 24 amostras de fetos com trissomia foram claramente distinguidas das 26 amostras de fetos normais. A metodologia validada foi aplicada a 44 amostras de DNA livre extraídas de plasma de gestantes (21 amostras de fetos com trissomia do 21 e 23 de fetos normais), porém não foi possível fazer a distinção entre fetos normais e fetos com trissomia do 21, possivelmente devido à variações na fração fetal do DNA livre em relação à fração materna. Como nosso objetivo principal não foi alcançado, Propomos aqui que o teste realizado em líquido amniótico seja utilizado como uma alternativa mais simples, rápida e barata ao cariótipo convencional atualmente utilizado para fazer o diagnóstico da trissomia do cromossomo 21 em amostras coletadas por procedimentos invasivos, enquanto as deficiências do teste não-invasivo pelo plasma materno são aprimoradas.

Descritores: diagnóstico pré-natal/métodos; síndrome de Down; plasma; DNA/sangue; cromossomos humanos par 21; líquido amniótico; feto.

Summary

Romão RM. *Development of a trisomy 21 test by analysis of fetal nucleic acids in maternal plasma by next-generation sequencing* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

The purpose of this study was to develop a test for trisomy 21 by analyzing cell-free fetal nucleic acids in maternal plasma by next-generation sequencing performed on automated sequencer Ion Torrent. The proposed methodology for the test is based on analysis of SNPs with high heterozygosity rates in Brazilian population, located in two genes present on chromosome 21 (PLAC4 and C21orf105), and the detection of the extra copy of chromosome 21 is made by the allelic-ratio of these SNPs, where 1:1 ratio indicates a normal fetus, and the 2:1 ratio indicates that the fetus has an extra copy of chromosome 21. In order to validate the methodology 50 cell-free DNAs extracted from amniotic fluid were used representing a gold standard since it contains abundant genetic material exclusively from the fetus. The methodology has been successfully validated in these samples, all the 24 samples from fetuses with trisomy 21 were clearly distinguished from 26 samples of normal fetuses. The validated method was applied to 44 cell-free DNA samples extracted from plasma of pregnant women (21 samples from fetuses with trisomy 21 and 23 from normal fetuses), but unfortunately it was not possible to distinguish between normal and trisomy 21 fetuses, possibly due to variations on the fetal fraction of the cell-free DNA in relation to maternal fraction. As our main goal was not achieved, we propose here that the test performed on amniotic fluid sample could be used as a simpler, faster and cheaper alternative test to traditional karyotype, which is used nowadays to make the diagnosis of trisomy 21 in samples collected by invasive procedures. In parallel, minor improvements in the described method may enable its clinical use

Descriptors: prenatal diagnosis; Down syndrome; plasma; DNA/blood; chromosomes, human, pair 21; amniotic fluid; fetus.

1. Introdução

A detecção precoce e não invasiva de doenças genéticas é há muitos anos o objetivo de intensas pesquisas da área da medicina fetal. Entre as síndromes genéticas fetais, a de maior frequência global é a síndrome de Down, em sua maior parte provocada pela presença de uma cópia extra do cromossomo 21. Sua incidência é de um a cada 700 nascimentos (Hattori et al., 2000), e aumenta com o avanço da idade materna.

A identificação de alterações cromossômicas e genéticas fetais pode ser feita através de testes pré-natais, que incluem tanto testes de rastreio como testes diagnósticos. Geralmente, o rastreio é oferecido a todas as gestantes e utiliza a idade materna, exames bioquímicos e ultrassonográficos para calcular o risco do feto possuir alguma alteração. O rastreio, portanto, possui desempenho sub-ótimo, pois não analisa diretamente material genético do feto (Malone et al., 2005). Resultados positivos nos exames de rastreio indicam diretamente a realização de testes diagnósticos que envolvem procedimentos invasivos (biópsia de vilosidades coriônicas, amniocentese e cordocentese) para obter material genético fetal para fazer o diagnóstico definitivo. Embora esses procedimentos sejam o padrão ouro para o diagnóstico pré-natal, eles estão associados a risco de aborto ou dano ao feto

(de 0,5 a 1%), o que leva algumas gestantes a recusarem sua realização (Mujezinovic et al., 2007).

A descoberta de que sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) livre (extracelular) proveniente do feto é liberada para a circulação materna, em 1997, forneceu uma nova ferramenta para o desenvolvimento de testes pré-natais não invasivos, pois este material genético fetal pode ser obtido através de uma simples punção venosa (Lo et al., 1997). Além de DNA fetal livre, foram encontrados circulando no plasma materno sequências de ácido ribonucleico (RNA) mensageiros fetais (Poon et al., 2000).

Após sua descoberta, diversas características biológicas dos ácidos nucleicos livres circulantes foram investigadas. O DNA presente no plasma materno é uma mistura dos DNAs livres da mãe e do feto, sendo que a parte fetal é representada apenas por uma pequena porção do total, a qual pode ser detectada por reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do 18º dia de gestação (Guibert et al., 2003).

Entende-se por ácido nucleico livre o DNA/RNA extracelular presente na circulação. Este DNA/RNA livre encontra-se fragmentado e associado a proteínas do núcleo das células (nucleossomos). Essas características (fragmentação e associação a proteínas nucleares) sugerem que o DNA/RNA livre seja liberado através do mecanismo de morte celular programada (apoptose). Tanto as moléculas de DNA/RNA livre fetais quanto as maternas

são compostas de pequenos fragmentos de DNA/RNA de até 200 pares de bases (Chan et al., 2004), sendo que os fragmentos fetais são sempre menores que os fragmentos maternos (Lo et al, 2010).

Embora a origem exata e os mecanismos de liberação dos ácidos nucleicos livres fetais para a circulação materna não estejam totalmente elucidados, um grande número de estudos sugere que a placenta seja sua principal fonte. Em contraste especula-se que o DNA livre materno tenha origem predominantemente hematopoiética de acordo com os modelos de transplante de medula óssea em pacientes e doadores de sexo oposto (Lui et al., 2002).

A fração da concentração do DNA fetal atinge até 10% do total circulante no plasma materno em média na gestação inicial, porém esses valores podem variar de acordo com algumas características das gestantes e do feto, e aumentam com a progressão da gestação (Lo et al., 1998). O sequenciamento paralelo em massa demonstrou que todo o genoma fetal e materno estão representados no DNA livre circulante em proporções relativas constantes (Lo et al., 2010). Após o parto, os ácidos nucleicos fetais são completamente eliminados da circulação materna, o que é essencial para seu uso no diagnóstico pré-natal porque garante que o ácido nucleico fetal livre de gestações anteriores não interferir nos testes em gestações subsequentes.

Atualmente se mostram factíveis, e já são utilizados em casos clínicos como rotina em diversos países, testes de diagnóstico não invasivo pré-natal que detectam sequências de DNA livre fetal que possuem características genéticas de herança paterna ou mutações pontuais associadas a patologias com base genética conhecida, pois essas sequências estão ausentes no genoma materno. O teste é feito através de uma análise qualitativa que identifica a presença ou ausência de DNA específico do pai ou da mutação no plasma materno. As aplicações clínicas desses testes são determinação do sexo fetal onde se identifica a presença ou ausência de sequências do cromossomo Y (Hill et al., 2011; Hill et al., 2012), determinação do RhD fetal nos casos em que a mãe é RhD negativo, onde se identifica a presença ou ausência de sequências do gene Rhesus D (Finning et al., 2004), e determinação de paternidade em medicina forense onde é investigado um painel de SNPs ou *Short Tandem Repeats* e se faz a comparação entre os genótipos maternos e dos possíveis pais (Wagner et al., 2009; Guo et al., 2012).

Já a diferenciação quantitativa dos ácidos nucleicos plasmáticos é mais complexa, por não se distinguir o que é DNA materno do fetal. Para a correta identificação da síndrome de Down fetal durante a gestação a quantificação precisa dos ácidos nucleicos fetais é imprescindível, uma vez que essa síndrome é causada pela presença de uma cópia a mais do cromossomo 21 e não por alguma mutação que esteja ausente no genoma materno. Porém, tanto a mãe quanto o feto possuem as mesmas sequências do cromossomo 21 em

seu genoma, então se essas sequências forem isoladas da circulação materna, DNA livre da mãe e do feto serão analisados em conjunto, pois não há uma maneira de distingui-los.

Diversas estratégias foram propostas para distinguir ácidos nucleicos maternos e fetais, entre estas, a quantificação de alelos fetais em heterozigose. Tal abordagem requer a segregação de material genético materno e fetal, e isso foi obtido engenhosamente pela identificação de genes exclusivamente expressos pela placenta, e cujos RNAs mensageiros estivessem presentes em níveis razoáveis e de forma universal no plasma de mulheres grávidas. Alguns pesquisadores já demonstraram a aplicabilidade dessa estratégia, utilizando diferentes metodologias para calcular a razão entre os alelos, como espectrometria em massa (Lo et al., 2007; e Zhang et al., 2012), ensaio multiplex SNaPshot (Yang et al., 2014) e RT-MLPA (*reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification*) seguida de eletroforese capilar (Deng et al., 2011).

Em trabalho prévio recém-concluído, nosso grupo identificou SNPs em alguns genes expressos pela placenta (PLAC4 e C21orf105), em 200 amostras de indivíduos brasileiros. Nossa proposta é utilizar estas informações para desenvolver um teste para a trissomia do cromossomo 21 através da quantificação destes SNPs do DNA livre circulante obtido do plasma materno em fase precoce da gravidez, e posterior sequenciamento de última geração,

que garantirá a precisão da metodologia, além de permitir a análise simultânea de um número razoável de amostras. Durante nosso projeto coletamos um grupo valioso de 240 pares de amostras de plasma e líquido amniótico de gestantes que foram submetidas a procedimento invasivo para a realização de cariótipo, entre as quais algumas com confirmação da trissomia do cromossomo 21. Essas amostras servirão para validar, através de estudo cego, a metodologia aqui proposta. As amostras de líquido amniótico serão utilizadas como controle da validação do método

2. Objetivos

- Detectar e quantificar, no líquido amniótico, DNA fetal livre que contém os SNPs que fazem parte do painel previamente descrito durante o projeto de mestrado.
- Detectar e quantificar, no plasma materno, DNA fetal livre que contém os SNPs que fazem parte do painel previamente descrito para simular o teste não invasivo da trissomia do cromossomo 21 fetal.

3. Revisão de Literatura

3.1 Investigação da síndrome de Down durante a gestação

Nos últimos 50 anos houve uma série de avanços marcantes no que diz respeito à investigação da síndrome de Down durante a gestação. Durante os anos 70 e começo dos anos 80, a idade materna avançada (acima de 35 anos) era a única indicação de investigação da síndrome da população em geral, e por causa disso apenas cerca de um terço dos casos de síndrome de Down eram diagnosticados durante o pré-natal, utilizando procedimentos invasivos (biopsia de vilosidades coriônicas e amniocentese). (Benn et al., 2013)

No que diz respeito aos riscos associados a esse procedimento invasivo (perda fetal em 0,5 a 1% dos casos), não era vantajosa a realização destes procedimentos baseada apenas na indicação de idade materna avançada, uma vez que em todos os procedimentos realizados, alterações no cariótipo eram encontradas em apenas 2% das amostras (Ferguson-Smith & Yates, 1984; Tabor & Alfirevic, 2010).

No final dos anos 80 e início dos anos 90 houve a introdução da pesquisa de marcadores sorológicos maternos no segundo trimestre de gestação (sob a forma de teste duplo, triplo ou quádruplo), para serem utilizados como rastreio dessa aneuploidia. A proporção de casos de síndrome de Down diagnosticados mais do que dobrou com a introdução dos testes sorológicos de rastreio, e quando o teste de rastreio era positivo, a aneuploidia

era encontrada em 4% das amostras colhidas por procedimento invasivo para confirmação da suspeita (Benn et al., 2004).

No final dos anos 90 e começo dos anos 2000 os testes de rastreio passaram a ser realizados no primeiro trimestre de gestação com a utilização do teste combinado, que utiliza a medida da translucência nugal por ultrassonografia juntamente com a dosagem no soro materno da fração livre da gonadotrofina coriônica humana (β -hCG livre) e proteína plasmática A associada à gestação (PAPP-A). Atualmente, os protocolos de rastreio disponíveis também incorporaram outros marcadores ultrassonográficos (identificação do osso nasal fetal e malformações fetais). Consequentemente, o desempenho dos testes de rastreio aumentou consideravelmente, sendo que até 90% dos casos de síndrome de Down são diagnosticados durante o pré-natal baseado neste protocolo e as alterações encontradas no cariótipo das amostras colhidas por procedimentos invasivos subiram para 6% (Cuckle & Benn, 2010; Syngelaki et al., 2011).

Recentemente, a análise do DNA livre fetal no sangue materno tem sido utilizada comercialmente como um teste de rastreio pré-natal não invasivo de alto desempenho para a investigação das aneuploidias cromossômicas fetais mais comuns. A seguir faremos uma revisão dos conhecimentos atuais acerca desses ácidos nucleicos livres na circulação

sanguínea e quais metodologias estão sendo utilizadas nos testes de rastreio da síndrome de Down.

3.2 Ácidos nucleicos livres na circulação sanguínea

Pequenas quantidades de DNA extracelular na circulação de indivíduos saudáveis e doentes foram primeiramente descrita em 1948 (Mandel & Metais, 1948). Em 1977, Leon e colaboradores descreveram a presença de grandes quantidades de DNA extracelular de tumor no soro de pacientes com câncer de pâncreas (Leon et al, 1977). A partir dos anos 90 os ácidos nucleicos livres foram reconhecidos como potenciais marcadores precoces de alguns tipos de câncer.

Em 1997 Dennis Lo detectou pela primeira vez sequências de DNA livre fetal do cromossomo Y circulando no soro e plasma de gestantes de fetos do sexo masculino (Lo et al., 1997). Essa descoberta foi muito importante para o desenvolvimento de testes de diagnóstico pré-natal não invasivo.

Hoje em dia sabe-se que, não apenas o cromossomo Y, mas todo o genoma fetal, juntamente com o materno, estão representados no DNA livre circulante em proporções relativas constantes (Lo et al., 2010). Inicialmente, as análises quantitativas do DNA fetal através de PCR em tempo real demonstraram que este compõe de 3 a 6 % do total circulante (Lo et al., 1998). Entretanto, as recentes aplicações de técnicas de quantificação mais

precisas (como PCR digital e sequenciamento paralelo em massa) tem demonstrado que a fração da concentração do DNA fetal atinge, em média, até 10% do total circulante no plasma materno na gestação inicial (Chui et al., 2011), mas esses valores podem variar de acordo com algumas características das gestantes e do feto (índice de massa corpórea, raça, tabagismo, realização de exercícios físicos, presença de alterações cromossômicas fetais, entre outras) (Lapaire et al., 2009; Ashoor et al., 2012a; Schlütter et al., 2014; Chui et al., 2011). As concentrações de DNA livre fetal no sangue materno aumentam conforme a gestação progride (Lo et al., 1998).

Não apenas DNA livre fetal, mas também RNA mensageiro (mRNA) fetal livre pode ser isolado do plasma de gestantes (Poon et al., 2000). Esta descoberta foi uma surpresa, dada a conhecida fragilidade da molécula de RNA à degradação pelas inúmeras enzimas (RNases) presentes na circulação sanguínea. Esta surpreendente estabilidade das moléculas de RNA livre foi posteriormente explicada por sua ligação às proteínas nucleares (os nucleossomos), que as protegem da degradação por enzimas presentes no sangue (Ziegler et al., 2002; Tsui et al., 2006).

Diversos trabalhos confirmam que o mecanismo de liberação dos ácidos nucleicos para a circulação sanguínea é a apoptose. (Orozco et al., 2006). Os corpos apoptóticos formados durante o processo de apoptose são caracterizados por conter em seu interior os nucleossomos, que são

compostos por um octâmero de histonas central (proteínas nucleares) envolto por DNA de cerca de 160 a 180 pares de bases (Savill et al., 1993). Esse padrão de fragmentação é resultante da clivagem por nuclease dos nucleossomos, que mantém intacto o DNA que fica em contato com o nucleossomo, possuindo esse tamanho característico (Lo et al., 2010). Corpos apoptóticos, geralmente, contêm tanto DNA quanto RNA, mas nunca os dois simultaneamente (Halicka et al., 2000).

Quando as células do sangue são destruídas, elas entram em apoptose na própria circulação, o que facilita a liberação do DNA e do RNA fragmentado de seus núcleos. Por isso, a origem dos ácidos nucleicos maternos que circulam em seu sangue é majoritariamente das células do próprio sangue, esse fato foi confirmado por um trabalho realizado com pacientes femininas que receberam transplante de medula óssea de doadores do sexo oposto. Nesse trabalho sequências do cromossomo Y foram isoladas do plasma e soro dessas pacientes, o que confirmou que a origem do DNA circulante era predominantemente do doador da medula, ou seja, o DNA livre tem origem hematopoiética em indivíduos saudáveis (Lui et al., 2002).

Durante a gestação, o tecido fetal que fica em contato direto com a circulação sanguínea materna é a placenta, que é o órgão que conecta o feto em desenvolvimento ao organismo materno para permitir a entrada de nutrientes, eliminação de excretas e as trocas gasosas. Os trofoblastos são a

maior fonte de ácidos nucleicos fetais na circulação materna, os quais são liberados através da apoptose durante o crescimento e remodelamento placentário. Tal fato foi evidenciado pela presença de DNA livre fetal na circulação materna em gestações anembrionadas (Alberry et al., 2007) (presença de saco gestacional e trofoblasto, sem o feto), pela presença de marcadores epigenéticos da placenta no DNA fetal circulante (Chim et al., 2005), pela presença de anormalidades cariotípicas de mosaicismo confinado a placenta no DNA fetal circulante (quando a placenta possui um cariótipo diferente do feto, o que se encontra circulando no plasma materno é o cariótipo da placenta) (Masuzaki et al., 2004), e também foi confirmado por diversos trabalhos que estudaram placenta prévia (Sekizawa et al., 2002), placenta increta (Jimbo et al., 2003), mosaicismo confinado ao feto (Flori et al., 2004), doenças que causam sofrimento placentário (Smith et al., 1999) e pré-eclampsia (Ishihara et al., 2002).

Recentemente, utilizando técnicas de sequenciamento paralelo em massa, um grupo de pesquisadores realizou um estudo de alta resolução e demonstrou que o DNA livre fetal é eliminado da circulação materna em duas etapas que possuem cinéticas diferentes. A etapa inicial é mais rápida e possui uma meia vida média de 1 hora, enquanto a etapa subsequente é mais lenta e tem uma meia vida média de 13 horas. O desaparecimento total do DNA fetal em gestações normais acontece em um a dois dias no máximo após o parto (Yu et al., 2013).

O mRNA placentário pode ser detectado na plasma materno a partir da quarta semana de gestação e possui uma meia-vida média de 14,1 minutos (Chiu et al., 2006).

Como o ácido nucleico fetal corresponde apenas a uma pequena fração do total circulante no plasma materno, diversos cientistas tentam buscar metodologias que explorem as diferenças entre as moléculas fetais e maternas para fazer seu enriquecimento.

Uma diferença que pode ser explorada é o fato que diferentes tecidos expressam seus próprios RNAs mensageiros específicos, como é o caso da expressão gênica do tecido de origem exclusivamente fetal, a placenta, e seus mRNAs exclusivos são detectados no plasma materno (Ng et al., 2003). Alguns genes que expressam seus mRNAs exclusivamente na placenta estão localizados em cromossomos comumente associados à aneuploidias, como os genes PLAC4 (Lo et al., 2007; Tsui et al., 2014), o C21orf105 (Go et al., 2007; Go et al., 2008) e o *placenta-derived hypomethylated* DSCR4 (Du et al., 2011) localizados no cromossomo 21; e o gene SERPINB2 localizado no cromossomo 18 (Tsui et al., 2009). Sendo assim, esses mRNAs podem ser utilizados como marcadores para aneuploidias nesses cromossomos.

O fenômeno epigenético que altera a expressão do DNA sem alterar sua sequência, sendo na maioria dos casos feito pela metilação da citosina, também pode ser explorado para isolar sequências exclusivas do feto. O

padrão de metilação das sequências de DNA difere entre os diferentes tecidos, então, os genes que possuem metilação diferencial entre mãe e feto podem ser separados seletivamente através de *primers* metilação-específicos (Poon et al., 2002), tratamento das amostras com bissulfito (Chim et al., 2005; Tong et al., 2006) e através do método MBD (*methyl-CpG binding domain-based protein*) que seleciona regiões hipermetiladas do DNA (com grande densidade CpG) e as quantifica por PCR multiplex quantitativa (qPCR), que foi utilizado para os genes RASSF1A e HLCS (Lim et al., 2014).

Outra abordagem para o enriquecimento dos ácidos nucleicos fetais é a separação baseada em tamanho, pois é sabido que os fragmentos fetais são sempre menores que os fragmentos maternos. Estudos sugerem que a fragmentação do DNA circulante tem características apoptóticas, as quais são visualizadas por um padrão de bandas típico, que é resultado da clivagem dos nucleossomos (Li et al., 2004).

O sequenciamento de nova geração do DNA livre plasmático revelou que os fragmentos circulantes possuem por volta de 166 pb de tamanho, com uma pequena proporção apresentando um comprimento de cerca de 340 pb (Fan et al., 2010). O principal pico na distribuição do tamanho (166 pb) é muito semelhante ao comprimento do DNA que é enrolado em torno da unidade do core dos nucleossomos, que possui aproximadamente 146 pb (que corresponde a uma volta ao redor do nucleossomo e fica protegido da

degradação durante a apoptose), mais um fragmento de ligação de DNA de cerca de 20 pb. O sinal de 340 pb corresponde a uma estrutura de dinucleossomal (Szerlong et al., 2011). Outro estudo também com sequenciamento de nova geração mostrou que os fragmentos fetais são geralmente 20 pares de bases mais curtos que os maternos, possuindo em média 143 pb, que corresponde à porção do DNA enrolada em torno do core de nucleossomos sem o fragmento de ligação de DNA (Lo et al., 2010). Não está elucidado porque somente o DNA fetal perde esse fragmento de ligação no processo de apoptose, mas isso gera uma diferença de tamanho significativa entre as moléculas maternas e fetais, o que pode ser explorado para distingui-las.

3.3 Metodologias utilizadas para detecção não invasiva de aneuploidias fetais

Um feto aneuplóide possui um número alterado de cromossomos, o que faz com que a detecção não invasiva da aneuploidia seja tecnicamente mais difícil do que a detecção de mutações genéticas ou de herança paterna. Assim sendo, uma análise quantitativa extremamente rigorosa é necessária para identificar a alteração no número de cromossomos fetais, pois o DNA fetal livre é representado por apenas uma pequena fração do total que circula no plasma materno (que atinge até 10%). Em uma gestante de feto com trissomia do cromossomo 21, por exemplo, haveria um discreto aumento da

quantidade de DNA livre derivada do cromossomo 21 extra fetal circulando no plasma dessa gestante quando comparado ao DNA livre dos demais cromossomos. A extensão desse aumento é totalmente dependente da fração de DNA livre fetal, ou seja, se a fração de DNA livre fetal for 10% do total circulante no plasma de uma gestante de feto com trissomia do cromossomo 21, isso levaria a um aumento de apenas 5% no número de cópias de sequências do cromossomo 21, pois 90% de todas as sequências do cromossomo 21 circulantes são euplóides (maternas). (Liao et al., 2014)

Apesar de todos esses desafios técnicos, há um grande número de publicações que mostram a eficácia de testes que utilizam sequenciamento de nova geração para detecção não invasiva de aneuploidias cromossômicas fetais (Norton et al., 2012; Palomaki et al., 2011, Bianchi et al., 2012; Sparks et al., 2012a; Zimmermann et al., 2012; Ashoor et al., 2012b; Nicolaides et al., 2013, Lau et al., 2014) e, ao menos quatro trabalhos recentes reportam suas experiências iniciais com a inserção dos testes em laboratórios clínicos (Lau et al., 2012; Dan et al., 2012; Fairbrother et al., 2013; Futch et al., 2013), sendo que o primeiro deles foi lançado comercialmente nos Estados Unidos em outubro de 2011 (Agarwal et al., 2011).

Todos esses testes e estudos utilizam abordagens de sequenciamento de nova geração para a detecção da discreta alteração na quantidade de DNA livre gerada pela aneuploidia fetal e fazem a análise dos DNAs livres materno

e fetal em conjunto. Essas abordagens baseiam-se em amplificação das sequências de DNA livre isoladas, seguida de métodos quantitativos de contagem dessas sequências, e são atreladas à sofisticadas análises de dados utilizando diversas ferramentas de bioinformática para detectar as quantidades anormais de DNA livre provenientes do cromossomo fetal alterado.

Nos Estados Unidos, o primeiro teste disponível comercialmente foi o MaterniT21Plus™, desenvolvido pela empresa Sequenom (San Diego, CA, USA), que atualmente detecta as trissomias dos cromossomos 13, 16, 18, 21, and 22, algumas aneuploidias cromossômicas sexuais e microdeleções. A empresa Verinata Health, uma subsidiária da Illumina (Redwood City, CA, USA), oferece o teste Verifi™, sendo que o teste básico detecta somente as trissomias dos cromossomo 13, 18, e 21, e a versão estendida do teste detecta também aneuploidias cromossômicas sexuais. O teste Harmony™ Prenatal desenvolvido pela empresa Ariosa Diagnostics (San Jose, CA, USA) detecta as trissomias dos cromossomos 13, 18 e 21. A empresa Natera (San Carlos, CA, USA) oferece o teste Panorama™ que detecta as trisomias dos cromossomos 13, 18 e 21 assim como algumas aneuploidias em cromossomos sexuais e microdeleções. Enquanto as empresas Sequenom e Verinata utilizam o sequenciamento *shotgun* como método quantitativo de contagem de sequência de DNA, as empresas Natera e Ariosa o sequenciamento alvo como método quantitativo de contagem de sequência de DNA. (Allyse M et al., 2015)

Atualmente os testes que utilizam sequenciamento de nova geração para detecção não invasiva de aneuploidias cromossômicas fetais são oferecidos em mais de 60 países em todo o mundo, porém, um relatório recente mostrou que a América do norte responde por 64,5% de toda a demanda global desses testes, seguida pela Europa. Enquanto todas as empresas oferecem os testes para as aneuploidias cromossômicas mais comuns (trissomias 13, 18 e 21), o oferecimento dos testes para aneuploidias de cromossomos sexuais e para a sexagem fetal varia por empresa e por país, muitas vezes por questões éticas ligadas a determinação do sexo do feto. Os parceiros que distribuem os testes em países fora da empresa cede de origem, como laboratórios e clínicas, geralmente coletam as amostras localmente e as enviam aos laboratórios de origem para o processamento. Esses testes não são comercializados diretamente aos consumidores e devem ser solicitados por um médico. (Allyse M et al., 2015)

Os preços dos testes variam bastante ao redor do mundo. Nos Estados Unidos, variam de U\$795 a U\$3000, sendo que não há consenso para cobertura por empresas de seguro saúde, enquanto que os procedimentos invasivos como amniocentese e biópsia de vilosidades coriônicas são quase sempre cobertos pelas empresas de seguro privadas ou pelo sistema público de saúde (Allyse M et al., 2015). Na Europa, os preços variam de €631 a €858 (Chandrasekharan et al., 2014) e no Reino Unido variam de £400 a £900 (Morris et al., 2014). Em Hong Kong os preços variam aproximadamente de

4,500 a 8,000 Hong Kong Dollars (cerca de US\$580 a US\$1,000), e 3500 reais em nosso país, onde as empresas de seguro saúde privada não cobrem esses testes (Chandrasekharan et al., 2014).

Atualmente existem três métodos de contagem quantitativa diferentes: sequenciamento *shotgun*, sequenciamento alvo e sequenciamento seletivo de SNPs. Cada um deles será explorado com mais profundidade a seguir.

3.3.1 SEQUENCIAMENTO *SHOTGUN*

Sequenciamento *Shotgun* é uma técnica que gera *reads* de fragmentos de DNA de todos os cromossomos de uma forma não específica, pois todos os fragmentos de DNA livre presentes em uma amostra de plasma são sequenciados aleatoriamente (sequenciamento completo do genoma). Nessa técnica, dezenas de milhões de pequenos fragmentos de DNA são sequenciados simultaneamente e rapidamente em uma única corrida. As *reads* geradas em uma corrida são mapeadas contra o genoma humano para identificação de seu cromossomo de origem, e o número de *reads* mapeadas em cada cromossomo é contado. Se houver maior quantidade de *reads* do cromossomo 21, por exemplo, em relação a um cromossomo de referência, isso indicará a presença de um feto com trissomia do cromossomo 21. (Levy & Norwitz 2013)

Na maioria dos estudos publicados até o momento, o algoritmo utilizado para a detecção da aneuploidia fetal é baseado no cálculo da fração genômica do cromossomo alvo através da normalização contra um cromossomo assumidamente dissômico (cromossomo de referência), e o desvio do valor esperado da fração genômica do cromossomo de interesse em relação ao cromossomo de referência é geralmente expresso sob forma do Z-score. A maioria dos testes disponíveis comercialmente apresenta seus resultados como positivo ou negativo, baseados no Z-score ultrapassando um limiar pré-definido (Lau et al., 2014).

Todas as metodologias de contagem de *reads* de sequenciamento de nova geração utilizam vários tipos de abordagens de bioinformática e estatísticas na análise dos dados gerados pelo sequenciamento para identificar o número de cópias dos cromossomos fetais. Uma abordagem estatística comumente utilizada é a hipótese de rejeição única (*single-hypothesis rejection*), que elege valores de *cut-off* baseados em coortes previamente analisadas, e a detecção de aneuploidias fetais é feita quando as amostras caem fora desses valores de *cut-off* pré-estabelecidos. Esse tipo de abordagem é muito válida para as amostras que possuem frações de DNA fetal livre baixas ou até mesmo intermediárias, como mostra um estudo que alcançou 98,6% de taxa de detecção para trissomia do cromossomo 21 em amostras com frações de DNA fetal livre ditas “normais”, e quando foi feita a análise isolada de

amostras com 4% a 8% de fração de DNA livre fetal, essa sensibilidade caiu para 75% (Palomaki et al., 2011)

Alguns avanços na análise estatística dos dados têm permitido a identificação de casos de mosaicismo e expandido a detecção de aneuploidias para os 23 pares de cromossomos (Jiang et al., 2012). Um algoritmo conhecido como FCAPS (*Fetal Copy Number Analysis through Maternal Plasma Sequencing*) recentemente desenvolvido tornou possível a detecção de quase 100% das deleções/duplicações que são maiores que 10 mega bases em tamanho sem a necessidade de aumento na cobertura do sequenciamento (Chen et al., 2013).

Um problema com o sequenciamento paralelo em massa é que ele está sujeito a variação na eficiência da amplificação de cromossomos específicos, o que se deve ao conteúdo maior de guanossina-citosina (GC) desses cromossomos (Chiu et al., 2008). Isso pode levar a alteração na relação entre a fração genômica do cromossomo de interesse/cromossomo de referência, prejudicando a identificação das diferenças quantitativas no número de *reads* que indicaria um feto aneuplóide. Isso se traduz clinicamente em perda da sensibilidade do teste para cromossomos que possuem conteúdo GC alto, como é o caso dos cromossomos 13 e X (Chen et al., 2011; Bianchi et al., 2012, Chandrananda et al., 2014). Esse viés de conteúdo de GC pode ser corrigido através de uma etapa na análise dos dados chamada de LOESS

(*locally weighted scatterplot smoothing*) descrita por Alkan e colaboradores (Alkan et al, 2009).

Com o objetivo de aumentar o rendimento e reduzir os custos dos testes que utilizam sequenciamento paralelo em massa alguns pesquisadores estão utilizando estratégias de sequenciamento *multiplex*, no qual várias amostras são sequenciadas em uma única corrida, e isso é possível graças a utilização de códigos de barras que permitem a identificação das *reads* de cada amostra. (Chiu et al., 2011)

3.3.2 SEQUENCIAMENTO ALVO

O objetivo principal do sequenciamento alvo é fazer o enriquecimento de regiões de interesse antes do sequenciamento, ou seja, amplificar somente aquelas mais susceptíveis a alteração (como, por exemplo, os cromossomos mais comumente envolvidos em aneuploidias compatíveis com a vida, como 21, 13, 18, X e Y). A vantagem dessa abordagem é que ela requer consideravelmente menos *reads* durante o sequenciamento, e, conseqüentemente, diminui os custos e aumenta a eficiência (Sparks et al., 2012b). Esse tipo de sequenciamento difere do sequenciamento *shotgun* no que diz respeito às regiões amplificadas e sequenciadas, uma vez que o sequenciamento paralelo em massa analisa aleatoriamente regiões do genoma de todos os cromossomos, requerendo assim maior cobertura na corrida.

A identificação da aneuploidia fetal com sequenciamento alvo do DNA livre é realizada utilizando os mesmos princípios de contagem de *reads* mapeadas contra o genoma humano do sequenciamento paralelo em massa, portanto está sujeita às mesmas limitações, como o viés de conteúdo GC dos cromossomos e a baixa fração do DNA fetal livre no plasma materno. De fato, dados de sensibilidade e especificidade de estudos realizados com essa abordagem mostram resultados melhores para os cromossomos com conteúdo GC menor (sensibilidade de 100% para trissomia do 21 e de 98% para trissomia do 18 – Norton et al., 2012) em relação aos cromossomos com conteúdo GC alto (sensibilidade de apenas 80% para trissomia do cromossomo 13 - Ashoor et al., 2013).

3.3.3 SEQUENCIAMENTO SELETIVO DE SNPS

A inclusão de informação genotípica de SNPs permite uma análise mais profunda do DNA livre plasmático, gerando significativamente mais informação do que simplesmente mapear e contar o número de *reads* geradas em uma corrida de sequenciamento. O método do sequenciamento seletivo de SNPs fornece, portanto, uma abordagem mais qualitativa, permitindo a identificação da origem (materna ou fetal) das *reads* geradas no sequenciamento. Além disso, esse método permite que seja feita não somente a determinação do número de cópias de um cromossomo em particular, mas também a reconstrução de haplótipos para identificar anormalidades que

escapariam à detecção pelos métodos de contagem, como triploidia fetal. (Levy & Norwitz 2013)

Essa abordagem envolve a amplificação de milhares de SNPs específicos em uma única reação, seguida por sequenciamento de nova geração e análise de bioinformática sofisticada dos dados resultantes do sequenciamento. Através da análise de *locus* polimórficos, essa abordagem avalia a identidade e quantidade de cada alelo nas *reads* sequenciadas, as quais são avaliadas baseadas na hipótese do feto ser monossômico, dissômico ou trissômico. Após considerar as posições dos SNPs nos cromossomos e a possibilidade de ter havido recombinações, é calculada uma estimativa por máxima verossimilhança de o feto ser normal, aneuplóide (para os cromossomos 21, 13, 18, X e Y) ou triploide, e também é estimado se dissomia uniparental está presente. (Benn et al., 2013)

Essa abordagem de análise de SNPs permite que seja adicionado um controle de qualidade ao método, uma vez que amostras duvidosas são destacadas, as quais não seriam detectadas pelos métodos de contagem de *reads*. Estudos mostram que nenhum caso falso positivo foi encontrado utilizando este método. (Levy et al., 2013).

Como o método analisa a quantidade relativa de cada alelo em um *locus* polimórfico e não utiliza um cromossomo de referência, ele não está sujeito aos vieses de variações na amplificação. Por isso a sensibilidade é consistente

em todas as regiões do genoma interrogadas, o que pode ser demonstrado por dados clínicos de sensibilidade superiores a 99% para detecção de trissomia do cromossomo 21, trissomia do cromossomo 18 trissomia do cromossomo 13, monossomia do cromossomo X e triploidia (Zimmermann et al., 2012; Levy et al., 2013; Nicolaides et al., 2013; Dar et al., 2014).

3.4 A fração fetal do total de ácidos nucleicos circulantes no sangue materno

As metodologias não invasivas para detecção de aneuploidias fetais analisam o ácido nucléico livre fetal que circula no sangue materno, e esse material genético fetal circula juntamente com o materno. A fração em que ele se encontra é de extrema importância para uma detecção eficiente e confiável de anormalidades genéticas fetais.

Como essas metodologias baseiam-se na capacidade de detectar os aumentos proporcionais nas quantidades de ácidos nucleicos fetais livres derivados da aneuploidia do feto em contraste ao *background* muito maior de ácidos nucleicos maternos livres, a fração fetal é primordial para o desempenho do teste. Nas gestações de fetos com trissomias, o DNA fetal livre derivado do cromossomo extra do feto resulta no aumento da proporção de DNA fetal livre, quando comparado a gestações de fetos normais. A habilidade de identificar esse pequeno aumento de DNA fetal livre de um

dado cromossomo e, portanto, detectar a aneuploidia fetal, está diretamente ligada à fração fetal.

Se houver quantidades suficientes de DNA fetal livre no plasma materno, o teste pode fornecer uma contagem eficiente dos fragmentos de cromossomos fetais. Quanto maior for a fração fetal, melhor será a capacidade de distinção de gestações normais e gestações aneuplóides, portanto, melhor será a performance do teste. Porém, se a fração fetal for muito baixa, o desbalanço cromossômico fetal pode ser mascarado pela quantidade abundante da proporção materna de DNA livre, o que eleva as chances de obtenção de resultados falso-negativos. Alguns autores sugerem que o limite de detecção das metodologias não invasivas para detecção de aneuploidias fetais seja uma fração fetal de no mínimo 4% (Norton et al., 2012, Fiorentino et al., 2016)

A fração fetal de ácidos nucleicos está sujeita a variações como a idade gestacional (Lo et al., 1998; Suzumori et al., 2016), o índice de massa corpórea materno (Haghiac et al., 2012; Ashoor et al., 2013), etnia (Ashoor et al., 2013), presença de alterações fetais como aneuploidias (Rava et al., 2014; Suzumori et al., 2016) e até mesmo o tabagismo materno (Ashoor et al., 2013).

4. Casuística e Métodos

4.1 Casuística

Este estudo prospectivo foi realizado com 240 amostras de plasma e líquido amniótico de pacientes que recebem atendimento na Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), no período de agosto de 2009 a maio de 2014, que se encaixaram nos critérios descritos abaixo:

4.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

- Gestação única e feto vivo
- Gestantes que optaram pela realização de procedimento invasivo para estudo do cariótipo fetal durante o pré-natal após aconselhamento genético oferecido pela equipe de Medicina Fetal da Clínica Obstétrica da FMUSP

4.1.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

- Não obtenção do resultado do cariótipo fetal por falha de cultura do líquido amniótico
- Gestantes que optaram por sair do estudo durante o andamento do projeto

No momento da coleta, foi apresentado às pacientes o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – anexo 1), contendo todas as

informações sobre a pesquisa, previamente aprovada pela CAPPesq (Comitê de Ética e Pesquisa da FMUSP - Protocolo nº: 07889/08) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de São Paulo (Anexo 2). Foram coletadas amostras de líquido amniótico (cerca de 20 mL, dos quais 1 mL foi cedido à pesquisa), e entre 5 e 10 mL de sangue periférico (em tubos contendo anticoagulante EDTA e gel separador) da mesma gestante, quando a paciente optou por fazer o procedimento invasivo oferecido e aceitou participar da pesquisa. A decisão da paciente em realizar o procedimento não foi influenciada pela pesquisa e sim por indicação médica após aconselhamento genético.

Logo após a coleta, as amostras foram encaminhadas para o laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da USP (IMT-USP). No laboratório, os tubos de sangue foram centrifugados a 1.600 x g por 10 minutos, conforme protocolo previamente descrito por Chiu et al., 2001, e o líquido amniótico separado em alíquotas de 500 µL em tubos de polipropileno.

Todas as amostras foram cadastradas no sistema de código de barras do laboratório, e ambos os tubos receberam um adesivo com os respectivos códigos e são armazenados em freezer a -70 °C para posterior análise. Os critérios para a indicação clínica da amniocentese na Clínica Obstétrica do HC-FMUSP são: idade materna aumentada (>35 anos), translucência nucal

aumentada, presença de malformação fetal ao ultrassom e gestações anteriores com cromossomopatias.

A decisão para realização do exame é sempre do casal e somente é realizado após assinatura do termo de consentimento próprio para o procedimento adotado no serviço.

4.2 Métodos

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Virologia do Instituto de medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-USP) sob supervisão do Dr. José Eduardo Levi e com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do IMT-USP (nº 033/08 – Anexo 3).

Inicialmente foram utilizadas amostras de líquido amniótico, que foi nosso padrão ouro, pois contém apenas material genético de origem fetal para validar a metodologia proposta de quantificação de alelos fetais em heterozigose.

4.2.1 EXTRAÇÃO DE DNA FETAL LIVRE DE LÍQUIDO AMNIÓTICO PARA PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DOS *AMPLICONS*

A extração do ácido nucleico (DNA) fetal das amostras de líquido amniótico foi realizada utilizando-se o kit comercial QIAamp DNA Mini and Blood Mini (QIAGEN) e 400 µL de amostra.

O método é composto por quatro passos: lise, ligação, lavagem e eluição do ácido nucleico. O DNA presente no líquido amniótico encontra-se ligado a proteínas, o que requer sua lise para permitir a ligação seletiva à coluna QIAamp. Para tanto, as amostras são lisadas sob condições desnaturantes e digeridas a 56 °C com proteinase K e tampão apropriado, que garante a inativação de enzimas que degradam o DNA (DNases). Posteriormente o DNA é ligado à membrana de sílica da coluna QIAamp, em condições ajustadas por um tampão específico. Contaminantes são lavados em etapas subsequentes utilizando um tampão de lavagem, enquanto os ácidos nucleicos permanecem aderidos à membrana. A eluição do ácido nucleico é feita em 60 µL de tampão.

4.2.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E PUREZA DO DNA

A determinação da concentração e da pureza do DNA extraído das amostras de líquido amniótico foi realizada através de uma medida espectrofotométrica no equipamento Thermo Scientific NanoDrop 2000, seguindo as recomendações do fabricante, que indicam a utilização de 2 µL de amostra.

4.2.3 DESENHO DOS *PRIMERS* PARA PCR DE *AMPLICONS* DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

A base para o sucesso do sequenciamento é a obtenção de produtos de PCR (*amplicons*) de boa intensidade e de forma regular em toda e qualquer amostra. Para tanto desenhamos conjuntos de *primers* que cobrem os SNPs de interesse, gerando *amplicons* de tamanho aproximado de 150 pb (excluindo-se os *primers*), que é o tamanho ideal do fragmento para sequenciamento na plataforma Ion Torrent (Life Technologies).

É importante salientar que estes *primers* foram desenhados valendo-se do conhecimento previamente obtido no projeto de pesquisa que precedeu este atual, no qual fizemos o sequenciamento dos genes *PLAC4* e *C21orf105* de 200 brasileiros para verificar quais SNPs presentes nesses genes apresentavam a maior taxa de heterozigotos em nossa população (Fapesp Projeto “INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE *PLAC4* NA POPULAÇÃO BRASILEIRA”, 2008/06853-7).

4.2.4 SEQUENCIAMENTO DOS *AMPLICONS* DE LÍQUIDO AMNIÓTICO NO ION TORRENT

Na natureza, a incorporação de um dinucleotídeo trifosfato (dNTP) à fita do DNA em extensão envolve a formação de uma ligação covalente e a

liberação de pirofosfato e de um íon de hidrogênio com carga positiva (H^+). O dNTP somente será incorporado se ele for complementar à base final livre do *template* de DNA não pareado. O sequenciamento no Ion Torrent explora este fato através da detecção da mudança de pH quando ocorre a liberação do H^+ na incorporação do dNTP na reação.

O chip em que ocorre a reação de sequenciamento do Ion Torrent é formado por milhares de micropoços que contém cópias de uma única fita simples do *template* de DNA a ser sequenciado. Nesse chip são adicionados controladamente os reagentes DNA polimerase e os nucleotídeos dATP, dGTP, dCTP e dTTP de forma sequencial e cíclica. Se o nucleotídeo adicionado for complementar à base final livre da fita simples do *template* de DNA, ele será incorporado à fita em crescimento pela DNA polimerase. O íon H^+ que é liberado quando a incorporação acontece causa mudança no pH da solução, a qual é detectada pelo aparelho. Se o nucleotídeo adicionado não for complementar à base final livre do *template* de DNA não haverá incorporação nem reação bioquímica. As moléculas de dNTP não ligadas serão lavadas antes do novo ciclo de adição do dNTP seguinte. Quando há homopolímeros (repetição do mesmo nucleotídeo) no *template* de DNA, mais de um dNTP serão incorporados em um único ciclo, liberando o número correspondente íons H^+ o que aumenta proporcionalmente o sinal eletrônico captado pelo aparelho.

Todo o processo de sequenciamento no Ion Torrent consiste em quatro etapas diferentes: construção da biblioteca, amplificação da biblioteca por PCR em emulsão, enriquecimento da biblioteca e reação de sequenciamento.

Antes de partir para a construção da biblioteca nós amplificamos os seis *templates* de interesse (*amplicons*) de cada uma das amostras utilizando os pares de *primers* que tiveram a reação padronizada anteriormente.

Depois de amplificados, nós fizemos um *pool* equimolar (mesmo número de cópias) de todos os seis *amplicons* da mesma amostra em um mesmo tubo, utilizando como referência aquele *amplicon* que apresentou a menor concentração quando dosado no Qubit. Isso serve para garantir uma cobertura uniforme de cada um dos *amplicons*. A quantidade de cada *amplicon* no pool foi determinada através de uma calculadora online (<http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>) que permite a determinação do número de cópias de cada *amplicon*, baseada em seu tamanho (em pares de bases) e sua quantidade (em ng), de acordo com esta fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de cópias} = (\text{quantidade de DNA} * 6,022 \times 10^{23}) / (\text{tamanho} * 1 \times 10^9 * 650)$$

O preparo da biblioteca consiste em fragmentar o DNA alvo em até 200 pb e ligar os adaptadores para a reação de sequenciamento. Como todos nossos *amplicons* possuem tamanho menor que 200 pares de bases, nós não realizamos a etapa de fragmentação da biblioteca, pois seria desnecessária.

Para colocarmos mais de uma amostra de líquido amniótico por chip em uma mesma corrida, foi necessária a utilização de códigos de barras para identificar cada uma das amostras. Esse código de barras corresponde a uma sequência de nucleotídeos conhecida que é ligada a cada fragmento de uma mesma amostra, as quais são identificadas e separadas pelo software do equipamento no final de cada corrida.

Para tanto utilizamos o kit de preparo de biblioteca Ion Plus Fragment Library Kit (Life Technologies) juntamente como kit de códigos de barras Ion Xpress *Barcode* Adapters Kit (Life Technologies) e seguimos o protocolo recomendado pelo fabricante. Depois de ligar os *barcodes* e adaptadores fizemos a dosagem de cada amostra através de uma PCR em tempo real quantitativa utilizando o Ion Library Quantitation Kit (Life Technologies) para determinar o fator de diluição de cada amostra para fazer os *pools*. Esta etapa é necessária para garantir que as bibliotecas marcadas com *barcodes* estejam em quantidades equimolares, e que assim, tenham representação uniforme na corrida de sequenciamento.

Após fazer o *pool* das amostras de uma corrida partimos para a PCR em emulsão no equipamento Ion One Touch, utilizando o Ion One Touch 200 *Template* Kit v2 (Life Technologies) seguindo os passos descritos no protocolo do kit. Após a PCR em emulsão fizemos o enriquecimento da biblioteca no equipamento Ion One Touch ES, seguindo os passos descritos no protocolo

do kit. Após o enriquecimento da biblioteca fizemos a reação de sequenciamento e aplicamos o *pool* de amostras no chip seguindo os protocolos do kit Ion PGM Sequencing 200 Kit (Life Technologies). O chip utilizado para esta corrida foi o Ion 314 (Life Technologies), que tem capacidade de sequenciar até 10 Mb por corrida, com duração de 2 horas.

As análises dos resultados das corridas foram feitas no software CLC Bio, através do alinhamento das *reads* contra sequências referência de cada um dos *amplicons*, onde já se encontravam destacadas as posições dos SNPs de interesse. O próprio software CLC possui uma ferramenta, o *Variant Calling*, que faz o cálculo da porcentagem de cada um dos alelos dos SNPs, o que facilitou bastante nossas análises.

4.2.5 EXTRAÇÃO DE DNA LIVRE FETAL DE PLASMA DE GESTANTE

Diversas metodologias para extração de ácidos nucleicos fetais são descritas na literatura. Em nosso trabalho avaliamos duas metodologias diferentes para extração de ácidos nucleicos fetais: QIAamp Circulating Nucleic Acids (QIAGEN) e MagNAPure Compact (Roche).

As extrações com o QIAamp Circulating Nucleic Acids (QIAGEN), teve bom rendimento, porém estanho é uma metodologia automatizada. A extração com o MagNAPure Compact (Roche) apresentou um bom

rendimento e tem a vantagem de ser uma metodologia automatizada, portanto foi a metodologia de escolha para nosso estudo.

MAGNAPURE COMPACT (ROCHE)

É uma metodologia automatizada para extração de ácidos nucleicos totais de 1 mL de amostra de plasma, com eluição em 50 μ L. Nesse aparelho é possível extrair 8 amostras de uma vez em 35 minutos, além disso o equipamento possui luz UV garantindo a esterilização interna. O kit utilizado para extração de DNA fetal livre de plasma de gestante foi o MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I – Large Volume (Roche).

O princípio da extração dos ácidos nucleicos é baseado na tecnologia de partículas de vidro magnéticas MagNA Pure. As amostras são lisadas através da incubação com Proteinase K e um tampão de incubação especial contendo sais caotrópicos. As partículas de vidro magnéticas são adicionadas e os ácidos nucleicos são imobilizados em sua superfície. As substâncias que não são imobilizadas (como proteínas, debris celulares, inibidores de PCR, etc.) são removidas por etapas de lavagem subsequentes. Os ácidos nucleicos purificados são eluídos das partículas de vidro magnéticas.

5. Resultados

5.1 Coleta das amostras

Foram coletadas 240 amostras de plasma e líquido amniótico das mesmas gestantes. A tabela 1 mostra os resultados dos cariótipos dessas amostras em viló corial, líquido amniótico e sangue fetal.

Tabela 1. Resultados do cariótipo das amostras coletadas para o projeto

Resultado do Cariótipo	nº de casos
46 XX	68
46 XY	59
Síndrome de Turner (45 XO)	16
Mosaico para Síndrome de Turner (45 X0)	1
Trissomia do cromossomo 13	9
Mosaico Trissomia do cromossomo 13	2
Translocação robertsoniana do cromossomo 13	1
Trissomia do cromossomo 18	21
Mosaico Trissomia do cromossomo 18	2
Trissomia do cromossomo 21	24
Translocação robertsoniana do cromossomo 21	1
Adição	1
Deleção	2
Translocação	2
Duplicação	2
Inversão do cromossomo 9	3
Resultados diversos	4
Triploidia	2
Sem resultado	6
Falha de cultura	9

*2 amostras de falha de cultura foram repetidas e tiveram resultados bem sucedidos na segunda amostra

5.2 Extração e Determinação da Concentração de DNA fetal de líquido amniótico

Para a validação da metodologia de sequenciamento de *amplicons* utilizamos 50 amostras de líquido amniótico, 24 com cariótipo confirmado para trissomia do cromossomo 21 e 26 com cariótipo normal confirmado (46 XX ou 46 XY). Fizemos a extração do DNA dessas amostras utilizando 400 µL de líquido amniótico e o kit QIAamp DNA Mini and Blood Mini (QIAGEN). Os resultado do cariótipo e idades gestacionais estão mostradas na tabela 2.

Tabela 2. Resultado do cariótipo e idade gestacional das amostras de líquido amniótico

Amostra	Cariótipo	Idade Gestacional
1	46 XY	29 s
3	46 XY	29 s e 3 d
7	47 XX + 21	13 s e 3 d
10	47 XX + 21	29 s e 1 d
25	46 XY + 21 der (21;21)(q10;q10)	28 s e 4 d
38	47 XX + 21	24 s e 4 d
53	47 XY + 21	22 s
72	47 XX + 21	26 s
76	47 XY + 21	15 s e 3 d
97	47 XX + 21	20 s e 4 d
101	47 XY + 21	15 s e 1 d
108	47 XY + 21	20 s e 2 d
110	47 XY + 21	17 s e 2 d
117	47 XY + 21	22 s e 3 d
121	47 XX + 21	31 s e 4 d
131	47 XX + 21	17 s e 6 d
138	47 XY + 21	20 s e 5 d
153	46 XX	28 s e 6 d
154	47 XY + 21	24 s e 1 d
158	46 XX	32 s

159	46 XX	31 s e 6 d
161	46 XX	23 s
162	46 XX	19 s
163	46 XY	20 s e 6 d
165	46 XX	20 s e 3 d
168	46 XX	22 s e 5 d
170	46 XX	32 s
172	46 XX	26 s e 6 d
174	47 XX + 21	27 s e 3 d
177	46 XY	24 s e 5 d
179	46 XY	17 s e 2 d
190	47 XY + 21	32 s e 4 d
191	46 XX	19 s e 2 d
194	47 XX + 21	24 s e 4 d
195	46 XX	28 s e 5 d
198	46 XY	31 s e 1 d
199	46 XX	27 s e 4 d
200	46 XX	28 s e 4 d
202	46 XX	22 s e 3 d
203	46 XY	34 s e 4 d
205	46 XX	27 s e 6 d
207	46 XY	15 s e 5 d
215	47 XX + 21	24 s e 4 d
220	47 XX + 21	24 s e 2 d
224	47 XY + 21	15 s e 5 d
226	46 XY	32 s e 3 d
227	46 XY	20 s
228	46 XY	31 s
229	47 XY + 21	31 s
230	47 XY + 21	15 s e 3 d

5.3 Desenho dos *primers* e padronização da reação de amplificação de fragmentos dos genes **PLAC4** e **C21orf105** de líquido amniótico

Os *primers* para a amplificação dos fragmentos de interesse foram desenhados com base nas sequências do gene **PLAC4** e **C21orf105** disponíveis no “GenBank”, banco de dados do NCBI (National Center for

Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), e dos fragmentos que foram utilizados para o sequenciamento das amostras da população brasileira durante o projeto de mestrado. O desenho foi feito com a utilização do programa *Primer3* (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3>).

Foram utilizados os seguintes parâmetros para o desenho dos *primers*:

- Porcentagem de GC: de 40 % a 60 %
- Temperatura de *melting* (T_m): de 50 °C a 65 °C
- Tamanho: de 18 a 25 pares de bases
- Não pareamento dos *primers* senso e anti-senso entre si (*dimers*), e não emparelhamento dos *primers* com eles mesmos (*self-dimers*)

A qualidade dos *primers* foi verificada com o auxílio do programa Net *Primer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netplaunch/netplaunch.html>).

Os conjuntos de *primers* desenhados para amplificação de DNA de líquido amniótico, seus tamanhos, posição no gene e os SNPs cobertos por cada um estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Descrição dos pares de *primers* desenhados para o sequenciamento de *amplicons* de líquido amniótico no Ion Torrent

Fragmento	Gene	Posição no gene	Sequência	Tamanho	SNPs	% Heterozigoto
1	PLAC4	964-1107	TCTGCTTCAGCTTTGTGTGG	144	rs59066201	42,50%
			AGCTGGTTTGGGGAAAGAAG			
2	PLAC4	1238-1352	CCTTGAGTCCCCTTTAAGCA	115	rs61738364	1%
					rs61736857	26,50%
			ACACAGCCTTTCTGCACAGG		rs61735054	29%
4	PLAC4	3176-3292	CCTGACTCAAAGGATGAGCA	117	rs57618285	12%
					rs9305729	50%
			CTCAAGCAATCCTCCACCT		rs9305730	0%
5	PLAC4	4439-4586	CAAAGGCCTTACAAAGAATGTG	148	rs16998089	28,50%
			AGCCCAGGACACTGTTGAAT			
6	PLAC4	7427-7533	AAAGGAGTTCAAGGGCCAAT	107	rs73902944	31,50%
			AGAACATGTCAGGAAATTCAGC		rs73902945	0%
9	C21orf105	6-183	AGGCCTCAGTCTGTCTGCAT	178	rs6586266	55%
					rs117007625	1%
					rs61734253	5,50%
			AGATGGAGGGGTGGTAGGTC		rs73905786	0%

Para definir as condições ideais de ciclagem para cada fragmento desenhado anteriormente foram realizadas reações de amplificação de cada conjunto de *primers* através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional.

A PCR foi feita utilizando-se a enzima Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e o termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (Eppendorf).

As reações foram realizadas com volume final de 25 μL , nas seguintes condições: Tampão de PCR 1X (Tris HCl 20 mM, pH = 8,3, KCl 50 mM), 2,5 mM de MgCl_2 , 2,5 mM de dNTPs, 0,25 pmol/ μL de cada *primer* senso e anti-senso, 1,5 unidades da enzima Platinum Taq DNA polimerase e 250 ng de DNA.

Os ciclos de variação de temperatura utilizados foram os seguintes: 94 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 30 segundos, gradiente de temperatura de anelamento que variou de 50 °C a 70,5 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto.

Para confirmar a amplificação dos fragmentos definidos pelos pares de *primers* foram utilizados 5 μL do produto de PCR misturados a tampão de amostra (azul de bromofenol 6X) e corridos em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em tampão TAE (1X). A eletroforese foi realizada em cuba para sistema horizontal de eletroforese alimentada por fonte de eletroforese, nas seguintes condições: 100 V / 60 a por 25 minutos.

Foram considerados amplificados os produtos que, quando o gel foi exposto à luz ultravioleta, apresentaram bandas correspondentes a seus tamanhos (pares de bases) pela comparação a um padrão de peso molecular. Abaixo estão as imagens dos géis de agarose 2% (figuras 1 a 6) corado com Brometo de Etídio, dos produtos de PCR de cada conjunto de *primers*.

Figura 1. Gel de agarose 2% da PCR feita com gradiente de temperatura de anelamento do fragmento definido pelo par de *primers* 1, de 144 pares de bases

Figura 2. Gel de agarose 2% da PCR feita com gradiente de temperatura de anelamento do fragmento definido pelo par de *primers* 2, de 115 pares de bases

Figura 3. Gel de agarose 2% da PCR feita com gradiente de temperatura de anelamento do fragmento definido pelo par de *primers* 4, de 117 pares de bases

Figura 4. Gel de agarose 2% da PCR feita com gradiente de temperatura de anelamento do fragmento definido pelo par de *primers* 5, de 148 pares de bases

Figura 5. Gel de agarose 2% da PCR feita com gradiente de temperatura de anelamento do fragmento definido pelo par de *primers* 6, de 107 pares de bases

Figura 6. Gel de agarose 2% da PCR feita com gradiente de temperatura de anelamento do fragmento definido pelo par de *primers* 9, de 178 pares de bases

Nessas imagens podemos verificar que todos os *primers* apresentaram as bandas de tamanho correspondente ao fragmento desenhado. Alguns conjuntos apresentaram algumas bandas inespecíficas (1, 2, 4, 5, e 6). Para tentar eliminar essas bandas inespecíficas fizemos um teste com diferentes quantidades de DNA na reação de amplificação (20 ng/ μ L e 5 ng/ μ L), utilizando a temperatura de anelamento de 58 °C, que é a temperatura que os conjuntos 1, 2, 4, 5, 6 e 9 apresentaram bandas correspondentes ao tamanho de seus fragmentos no gel de agarose 2%, ilustrados nas figuras 7 e 8.

Figura 7. Gel de agarose 2% dos produtos de PCR com 20 ng/ μ L de DNA e temperatura de anelamento de 58 °C

Figura 8. Gel de agarose 2% dos produtos de PCR com 5 ng/ μ L de DNA e temperatura de anelamento de 58 °C

Com esse teste, conseguimos eliminar as bandas inespecíficas para os fragmentos 1, 2, 5 e 6 utilizando 100 ng de DNA e 25 ng de DNA. Padronizamos então a reação de amplificação dos fragmentos para sequenciamento nas seguintes condições: 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,4 μM de cada *primer*, 0,5 mM de dNTPs, 0,05 U/ μL de Taq Platinum 100 ng de DNA, tampão 1 X em volume final de 25 μL , com temperatura de anelamento de 58 °C.

5.4 Sequenciamento dos *Amplicons* de Líquido amniótico no Ion Torrent

O sequenciamento das 50 amostras de líquido amniótico foi feito após amplificação das mesmas por PCR convencional para seis fragmentos do cromossomo 21, cinco do gene PLAC4 (1, 2, 4, 5 e 6) e um do gene C21orf105 (9), seguindo todas as recomendações descritas nos kits da empresa Life Technologies. Somente a etapa de fragmentação da biblioteca foi descartada, pois nossos fragmentos já possuem menos de 200 pares de bases.

Para fazer o sequenciamento das 50 amostras de líquido amniótico utilizamos 4 chips diferentes. A corrida inicial no sequenciador foi feita com apenas 4 amostras no chip (utilizando 4 *barcodes*), para testar a viabilidade do método. Nesse chip inicial foram corridas as amostras de líquido amniótico 1, 3, 7 e 10 e a corrida foi bem sucedida com 76% de micropoços carregados com *beads*, gerando aproximadamente 119.000 *reads* por amostra (uma

cobertura extremamente alta). Nos outros três chips colocamos 16 amostras por chip, utilizando um kit com 16 *barcodes*. Para o segundo chip a média de *reads* por amostra foi de 40.000 com 86% de micropoços carregados com *beads*. Para o terceiro e quarto chips a média de *reads* por amostra foi menor, de cerca de 10.000, pois o carregamento dos micropoços com as *beads* foi menor, de cerca de 40%. A diminuição no carregamento dos micropoços do chip acarreta consequentemente diminuição no número de *reads* sequenciada por amostra, mas, mesmo assim, isso não interferiu nas análises, uma vez que, mesmo com média de 10.000 *reads* por amostra, a cobertura dos fragmentos sequenciados continua sendo alta e suficiente (mínimo de 150).

Na figura 9 está exemplificado o *report* de um resultado de sequenciamento de amostras de líquido amniótico com 16 amostras por chip, mostrando o carregamento do chip, número de *reads* total, número de *reads* usáveis e tamanho médio dos fragmentos sequenciados. Na tabela 4 estão dois exemplos de resultados da análise realizada no software CLC Bio mostrando a frequência de cada um dos alelos dos 9 SNPs analisados, um de uma amostra normal e outro de uma amostra com trissomia do 21. A presença de uma única barra por SNP indica que o feto possui apenas um alelo, sendo assim homozigoto para este SNP. Já a presença de duas barras por SNP indica que o feto possui dois alelos, sendo assim heterozigoto para este SNP.

Run Summary

Figura 9. Exemplo do *report* de uma corrida feita com 16 amostras de DNA de líquido amniótico, mostrando o carregamento do chip, o número total de *reads*, número de *reads* usáveis, e a média do comprimento dos fragmentos sequenciados

Tabela 4. Tabela com resultados das frequências de cada alelo dos SNPs sequenciados para as amostras (o alelo A está representado pela barra verde, o C pela barra azul, o G pela barra preta e o T pela barra vermelha)

Como podemos ver nos resultados da amostra 108 na tabela 4, o feto é heterozigoto para 5 SNPs (rs61735054, rs9305729, rs16998089, rs73902945 e rs6586266) e a trissomia do cromossomo 21 é identificada nesse feto pelo desbalanço na proporção dos alelos dos SNPs heterozigotos, onde um dos

alelos do SNP possui proporção de aproximadamente 0,7 e o outro de aproximadamente 0,3. Já os resultados da amostra 203 (de um feto normal) mostram que o feto é heterozigoto para 5 SNPs (rs59066201, rs7618285, rs9305729, rs16998089, e rs6586266) e não há desbalanço na razão dos alelos desses SNPs, que pode ser observado pela proporção de aproximadamente 0,5 de cada alelo dos SNPs heterozigotos.

A tabela 5 mostra a distribuição de todas as amostras normais e de todas as amostras com trissomia do 21 de acordo com as médias da razão da quantidade de *reads* do alelo com maior frequência sobre a quantidade de *reads* do alelo de menor frequência. Para as amostras que possuem mais de um SNP heterozigoto foi feita a média das médias das quantidades de *reads* dos alelos de todos os SNPs heterozigotos. Como podemos ver, há uma diferença clara entre as amostras normais e as amostras com trissomia do cromossomo 21, portanto todas puderam ser distinguidas entre si, com 100% de sensibilidade e especificidade.

Tabela 5. Distribuição das médias das razões das quantidades de *reads* dos SNPs informativos das amostras normais e das amostras com trissomia do cromossomo 21 (T21)

5.5 Extração e Determinação da Concentração de DNA fetal de Plasma de Gestante

Para verificar se a metodologia de sequenciamento de *amplicons* previamente validada com líquido amniótico funciona da mesma maneira no plasma de gestantes, utilizamos 44 amostras de DNA fetal livre extraído de plasma de gestante, 21 com cariótipo confirmado para trissomia do cromossomo 21 e 23 com cariótipo normal confirmado (46 XX ou 46 XY). Fizemos a extração do DNA livre dessas amostras utilizando 1000 μ L de plasma e o Kit MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I – Large Volume (Roche). O resultado do cariótipo e idades gestacionais estão mostradas na tabela 6.

Tabela 6. Resultado do cariótipo e idade gestacional das amostras de plasma de gestante

Amostra	Cariótipo	Idade Gestacional
25	46 XY + 21 der (21;21)(q10;q10)	28 s e 4 d
38	47 XX + 21	24 s e 4 d
53	47 XY + 21	22 s
72	47 XX + 21	26 s
76	47 XY + 21	15 s e 3 d
97	47 XX + 21	20 s e 4 d
101	47 XY + 21	15 s e 1 d
108	47 XY + 21	20 s e 2 d
117	47 XY + 21	22 s e 3 d
121	47 XX + 21	31 s e 4 d
131	47 XX + 21	17 s e 6 d
138	47 XY + 21	20 s e 5 d
149	46 XY	23 s e 1 d
150	47 XY + 21	13 s e 2 d
152	46 XY	15 s e 2 d
153	46 XX	28 s e 6 d
154	47 XY + 21	24 s e 1 d
161	46 XX	23 s
162	46 XX	19 s
163	46 XY	20 s e 6 d
165	46 XX	20 s e 3 d
167	46 XX	17 s e 1 d
168	46 XX	22 s e 5 d
172	46 XX	26 s e 6 d
173	46 XX	23 s e 4 d
177	46 XY	24 s e 5 d
178	46 XX	16 s e 4 d
179	46 XY	17 s e 2 d
180	46 XY	17 s e 2 d
183	46 XY	30 s e 2 d
190	47 XY + 21	32 s e 4 d
191	46 XX	19 s e 2 d
192	46 XX	16 s e 2 d
194	47 XX + 21	24 s e 4 d
199	46 XX	27 s e 4 d
211	46 XY	11 s e 4 d
215	47 XX + 21	24 s e 4 d
221	46 XY	28 s e 4 d
229	47 XY + 21	31 s
235	47 XY + 21	21 s e 1 d

236	47 XX + 21	16 s e 1 d
237	47 XX + 21	18 s e 2 d
238	46 XX	26 s e 5 d
240	46 XX	16 s e 3 d

5.6 Amplificação dos fragmentos dos genes PLAC4 e C21orf105 de DNA livre de plasma de gestantes

Além da amplificação dos 6 fragmentos padronizados para o líquido amniótico, nós incluímos mais um fragmento do gene PLAC4 que contém dois SNPs com taxa de heterozigosidade alta (chamado de fragmento 3). Esse fragmento foi desenhado da mesma maneira que os demais. Os conjuntos de todos os *primers* desenhados para amplificação de DNA de plasma de gestante, seus tamanhos, posição no gene e os SNPs cobertos por cada um estão descritos na tabela 7.

Tabela 7. Descrição dos pares de *primers* desenhados para o sequenciamento de *amplicons* de plasma de gestante no Ion Torrent

Fragmento	Gene	Posição no gene	Sequência	Tamanho	SNPs	% Heterozigoto
1	PLAC4	964-1107	TCTGCTTCAGCTTTGTGTGG	144	rs59066201	42,50%
			AGCTGGTTTGGGGAAAGAAG			
2	PLAC4	1238-1352	CCTTGAGTCCCCTTTAAGCA	115	rs61738364	1%
			ACACAGCCTTTCTGCACAGG		rs61736857	26,50%
					rs61735054	29%
3	PLAC4	1523-1701	TGGTGCTGAACGTGTGTTTT	178	rs9977003	43.5%
			AAACCGTGGGACCAGTGTAG		rs7844	47%
4	PLAC4	3176-3292	CCTGACTCAAAGGATGAGCA	117	rs57618285	12%
			CTCAAGCAATCCTCCCACCT		rs9305729	50%
					rs9305730	0%
5	PLAC4	4439-4586	CAAAGGCCTTACAAAGAATGTG	148	rs16998089	28,50%
			AGCCCAGGACACTGTTGAAT			
6	PLAC4	7427-7533	AAAGGAGTTCAAGGGCCAAT	107	rs73902944	31,50%
			AGAACATGTCAGGAAATTCAGC		rs73902945	0%
9	C21orf105	6-183	AGGCCTCAGTCTGTCTGCAT	178	rs6586266	55%
			AGATGGAGGGGTGGTAGGTC		rs117007625	1%
					rs61734253	5,50%
					rs73905786	0%

Para confirmar se as mesmas condições de ciclagem para cada fragmento desenhado para a amplificação de DNA livre de líquido amniótico se comportou da mesma maneira para DNA livre de plasma de gestante, foi realizada uma reação de amplificação de cada conjunto de *primers* através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional com amostras de DNA livre plasmático.

A PCR foi feita utilizando-se o kit HotStarTaq Master Mix (QIAGEN) e o termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (Eppendorf).

As reações foram realizadas com volume final de 25 μL , nas seguintes condições: HotStarTaq Master Mix (1,25 unidades de HotStarTaq DNA polimerase + 100 μM de cada dNTP + tampão de PCR 1X), 0,4 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ de cada *primer* senso e anti-senso e 250 ng de DNA.

Os ciclos de variação de temperatura utilizados foram os seguintes: 95 $^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos para ativação inicial da HotStarTaq Polimerase, seguido de 35 ciclos a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos, 58 $^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos e 72 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, e uma extensão final de 72 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos.

Para confirmar a amplificação dos fragmentos definidos pelos pares de *primers* foram utilizados 5 μL do produto de PCR misturados a tampão de amostra (azul de bromofenol 6X) e corridos em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em tampão TAE (1X). A eletroforese foi realizada em cuba para sistema horizontal de eletroforese alimentada por fonte de eletroforese, nas seguintes condições: 100 V / 60 a por 25 minutos.

Foram considerados amplificados os produtos que, quando o gel foi exposto à luz ultravioleta, apresentaram bandas correspondentes a seus tamanhos (pares de bases) pela comparação a um padrão de peso molecular. Abaixo (figura 9) está a imagem do gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídio, dos produtos de PCR das amostras de DNA 47 e 50 para cada conjunto de *primers* utilizados para amplificação de DNA livre de plasma de gestante.

Figura 10. Gel de agarose 2% da PCR feita com as amostras de DNA 47 e 50 mostrando a amplificação dos fragmentos 1 (144 pb), 2 (115 pb), 3 (178 pb), 4 (117 pb), 5 (148 pb), 6 (107 pb) e 9 (178 pb)

Como podemos ver na figura 9, as duas amostras de DNA apresentaram bandas de tamanhos correspondentes a todos os fragmentos desenhados (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9), sendo essas bandas fortes, únicas e sem a presença de bandas inespecíficas, indicando sucesso na amplificação. Todas as 44 amostras de plasma de gestante selecionadas para amplificação desses sete fragmentos foram amplificadas com sucesso, confirmando-se a amplificação pela presença de banda única visualizada em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídio.

5.7 Sequenciamento dos *Amplicons* de Plasma de Gestante no Ion Torrent

O sequenciamento das 44 amostras de DNA livre de plasma de gestante foi feito após amplificação das mesmas por PCR convencional para sete fragmentos do cromossomo 21, cinco do gene PLAC4 (1, 2, 3, 4, 5 e 6) e um do gene C21orf105 (9), seguindo todas as recomendações descritas nos kits da empresa Life Technologies. Somente a etapa de fragmentação da biblioteca foi descartada, pois nossos fragmentos já possuem menos de 200 pares de bases.

Para fazer o sequenciamento das 44 amostras de DNA livre de plasma de gestante utilizamos 2 chips diferentes. A corrida no sequenciador foi feita utilizando-se 22 amostras por chip (utilizando 22 *barcodes*) e dois chips no total. As amostras de fetos com trissomia do 21 e as amostras de fetos normais foram distribuídas aleatoriamente nos dois chips. A corrida do primeiro chip teve 88% de micropoços carregados com *beads*, gerando aproximadamente 22.597 *reads* por amostra (uma cobertura extremamente alta). A corrida do segundo chip teve 78% de micropoços carregados com *beads*, gerando aproximadamente 13.328 *reads* por amostra. Na figura 10 está exemplificado o *report* de um resultado de sequenciamento de amostras de plasma de gestante com 22 amostras por chip, mostrando o carregamento do

chip, número de *reads* total, número de *reads* usáveis e tamanho médio dos fragmentos sequenciados.

Run Summary

Figura 11. Exemplo do *report* de uma corrida feita com 22 amostras de DNA de plasma de gestante, mostrando o carregamento do chip, o número total de *reads*, número de *reads* usáveis, e a média do comprimento dos fragmentos sequenciados

A análise do resultado do sequenciamento foi realizada com o Software CLC Bio através do alinhamento das *reads* contra sequências referência de cada um dos *amplicons*, onde já se encontravam destacadas as posições dos SNPs de interesse. A ferramenta *Variant Calling* fez o cálculo da porcentagem de cada um dos alelos dos SNPs.

Temos em mente que ao extrair o DNA livre circulante no plasma de gestantes, somos obrigados a analisar DNA livre fetal e DNA livre materno

em conjunto, pois ainda não há uma maneira prática de distingui-los. Para fazer a detecção da cópia extra do cromossomo 21 fetal, montamos uma tabela com resultados esperados de proporção de alelos de SNPs, baseada nas possíveis combinações de genótipos materno e fetal para dado SNP. Ambos podem ser homozigotos ou heterozigotos, a mãe obrigatoriamente contém dois alelos para o SNP analisado e o feto pode conter dois ou três alelos para o SNP analisado. Assim sendo, as proporções totais de alelos informativos (somando alelos maternos e fetais) poderiam ser as seguintes: 4:1 ou 3:2, ambas demonstrando a presença de um feto com trissomia do cromossomo 21; e 2:2 ou 3:1, ambas demonstrando presença de um feto normal. E as proporções entre os alelos são calculadas levando em conta a fração fetal. Sugerimos frações fetais de 5% e de 10%, que são mostrados nas tabelas 8 e 9 abaixo, respectivamente.

Tabela 8. Estimativa da proporção de cada alelo do SNP para todas as combinações possíveis de genótipos materno e fetal para dado SNP, levando em conta a fração fetal de 10%

Proporção de Alelos	Fração Fetal de 10%			
	Genótipo da Mãe	Genótipo do Feto	% Alelo A	% Alelo B
4:1	AB	AAA	55%	45%
	AB	BBB	45%	55%
	AA	AAB	96,667%	3,333%
	BB	ABB	3,333%	96,667%
3:2	AB	AAB	51,667%	48,333%
	AB	ABB	48,333%	51,667%
2:2	AB	AB	50%	50%
3:1	AA	AB	95%	5%
	AB	AA	55%	45%
	BB	AB	5%	95%
	AB	BB	45%	55%

Tabela 9. Estimativa da proporção de cada alelo do SNP para todas as combinações possíveis de genótipos materno e fetal para dado SNP, levando em conta a fração fetal de 5%

Proporção de Alelos	Fração Fetal de 5%			
	Genótipo da Mãe	Genótipo do Feto	% Alelo A	% Alelo B
4:1	AB	AAA	52,5%	47,5%
	AB	BBB	47,5%	52,5%
	AA	AAB	98,3333%	1,6667%
	BB	ABB	1,6667%	98,3333%
3:2	AB	AAB	50,8333%	49,1667%
	AB	ABB	49,1667%	50,8333%
2:2	AB	AB	50%	50%
3:1	AA	AB	97,5%	2,5%
	AB	AA	52,5%	47,5%
	BB	AB	2,5%	97,5%
	AB	BB	47,5%	52,5%

Ao todo, foram analisados 10 SNPs com taxa de heterozigosidade alta na população brasileira. O SNP rs59066201 no fragmento 1, os SNPs rs59066201 e rs61735054 no fragmento 2, os SNPs rs9977003 e rs7844 no fragmento 3, os SNPs rs57618285 e rs9305729 no fragmento 4, o SNP rs16998089 no fragmento 5, o SNP rs73902945 no fragmento 6 e o SNP rs6586266 no fragmento 9. As tabelas 10 e 11 abaixo mostram esses resultados, onde estão listados todos esses SNPs com a porcentagem de *reads* que foi encontrada para cada alelo.

Tabela 10. Resultados da porcentagem de *reads* encontrada para cada alelo dos SNPs dos fragmentos 1, 2 e 3, mostrando o gene, fragmento, nome do SNP e posição do SNP

Gene	PLAC4									
Fragmento	1		2				3			
SNP	rs59066201		rs61736857		rs61735054		rs9977003		rs7844	
Posição	104		59		87		41		149	
Alelo	A	G/C	C	T	C	T	A	G	C	G
25 (T21)	100		100		100		57,4	46,4	60,0	40,0
38 (T21)	49,1	50,9	41,8	59,3	41,1	58,9	100			100
53 (T21)	100		96,8	3,2	96,7	3,3	66,6	33,4	50,8	49,2
72 (T21)	100		57,6	42,4	100		63,0	37,0	55,1	44,9
76 (T21)	48,8	51,2	42,3	57,7	1,3	98,7	100			100
97 (T21)	100		100		100			100	62,3	37,7
101 (T21)	43,8	56,2	100		100			100	100	
108 (T21)	100		100		100		51,7	48,3	55,7	44,3
117 (T21)	100		100		100		55,3	44,7	64,3	35,7
121 (T21)	100		40,0	60,0			65,3	34,7	54,2	45,8
131 (T21)	100		38,6	61,4	42,7	57,3	100			100
138 (T21)	100		100		100			100	100	
149 (Normal)	49,8	50,2	100		49,1	50,9		100	100	
150 (T21)	49,9	50,1	45,6	54,4	100		59,0	41,0	54,7	45,3
152 (Normal)	100		47,0	53,0	51,8	48,2	63,8	36,2		100
153 (Normal)	42,6	57,4	100		55,3	44,7	63,1	36,9	98,5	1,5
154 (T21)	100		100		100		56,1	43,9	58,4	41,6
161 (Normal)	100		93,3	6,7	94,4	5,6	1,8	98,2	98,9	1,1
162 (Normal)	49,9	50,1	100		100		100			100
163 (Normal)	100		100		100			100	58,3	41,7
165 (Normal)	100		100		100		9,3	90,7	96,7	3,3
167 (Normal)	51,7	48,3	100		100			100	100	
168 (Normal)	100		100		100		43,6	56,4	62,0	38,0
172 (Normal)	100		100		100			100	100	
173 (Normal)	100		100		100		1,8	98,2	100	
177 (Normal)	100		100		100		66,0	34,0	44,8	55,2
178 (Normal)	100		100		100		58,1	41,9	56,3	43,7
179 (Normal)	100		100		100		60,2	39,8	51,9	48,1
180 (Normal)	100		41,6	58,4	48,6	51,4	100			100
183 (Normal)	100		88,9	11,1	44,3	55,7	52,7	47,3	100	
190 (T21)	98,0	2,0	93,1	6,9	92,9	7,1	64,1	35,9	62,5	37,5
191 (Normal)	48,6	51,4	100		100			100	100	
192 (Normal)	100		98,3	1,7	55,4	44,6		100	100	
194 (T21)	44,9	55,1	100		96,3	3,7		100	60,1	39,9
199 (Normal)	42,4	57,6	100		100		53,8	46,2		100

211 (Normal)	40,2	59,8	42,4	57,6	47,9	52,1	52,8	47,2	54,2	45,8
215 (T21)	48,2	51,8	100		100		51,0	49,0	57,6	42,4
221 (Normal)	1,9	98,1	100		100			100	100	
229 (T21)	51,6	48,4	100		100			100	100	
235 (T21)	49,1	50,9	100		100			100	100	
236 (T21)	100		100		100			100	100	
237 (T21)	97,4	2,6	98,6	1,4	98,8	1,2	2,0	98,0	98,9	1,1
238 (Normal)	96,8	3,2	33,2	66,8	40,5	59,5	60,0	40,0		100
240 (Normal)	51,4	48,6	39,5	60,5	45,2	54,8	49,1	50,9	64,4	35,6

Tabela 11. Resultados da porcentagem de *reads* encontrada para cada alelo dos SNPs dos fragmentos 4, 5, 6 e 9, mostrando o gene, fragmento, nome do SNP e posição do SNP

Gene	PLAC4								C21orf105	
Fragmento	4				5		6		9	
SNP	rs57618285		rs9305729		rs16998089		rs73902945		rs6586266	
Posição	61		70		31		51		41	
Alelo	G	A	C	G	G	A	T	C	C	T
25 (T21)	100		50,1	49,9	100		100		49,8	50,2
38 (T21)	100		98,4	1,6	100		100		54,0	46,0
53 (T21)	100		54,2	45,8	100		100		55,1	44,9
72 (T21)	45,0	55,0	96,8	3,2	57,9	42,1	100		100	
76 (T21)	100			100	100		100		0,0	0,0
97 (T21)	100		100			100	50,4	49,6	52,2	47,8
101 (T21)	100			100	100		100		100	
108 (T21)	100		48,5	51,5	46,6	53,4	50,6	49,4	53,9	46,1
117 (T21)	100		50,3	49,7	100		100		51,3	48,7
121 (T21)	100		49,3	50,7	100		100		51,6	48,4
131 (T21)	46,4	53,6	100		45,1	54,9		100		100
138 (T21)	100			100	100		50,6	49,4	48,6	51,4
149 (Normal)	100		77,3	22,7	100		100		100	
150 (T21)	47,6	52,4	100		46,9	53,1	100		98,1	1,9
152 (Normal)	100		70,7	29,3	100		58,2	41,8		100
153 (Normal)	100		100		52,5	47,5	100		100	
154 (T21)	100		41,9	58,1	100		100		100	
161 (Normal)	100		2,2	97,8	100		100		50,7	49,3
162 (Normal)	100		100		100		1,9	98,1	92,5	7,5
163 (Normal)	100		100		100		51,4	48,6	38,8	61,2
165 (Normal)	100			100	100		100		55,9	44,1
167 (Normal)	100			100	100		100			100
168 (Normal)	51,7	48,3	100		2,0	98,0	100		45,1	54,9
172 (Normal)	100		100		100		100		100	
173 (Normal)	44,2	55,8	80,7	19,3	46,8	53,2			53,6	46,4
177 (Normal)	100		50,9	49,1	100		46,6	53,4	5,5	94,5
178 (Normal)	100		51,9	48,1	100		44,8	55,2	100	
179 (Normal)	100		41,9	58,1	48,3	51,7	51,9	48,1	96,9	3,1

180 (Normal)	100		100		100		46,2	53,8	44,1	55,9
183 (Normal)	49,5	50,5	81,3	18,8	52,7	47,3	100		48,6	51,4
190 (T21)	100		83,1	16,9	57,5	42,5	100			100
191 (Normal)	100		63,4	36,6	100		96,1	3,9		100
192 (Normal)	100		55,5	44,5	100		100		100	
194 (T21)	100		80,1	19,9	98,0	2,0	64,6	35,4	4,1	95,9
199 (Normal)	100		100		46,5	53,5	57,3	42,7	49,2	50,8
211 (Normal)	100		49,9	50,1	100		100		2,3	97,7
215 (T21)	100		45,9	54,1	100		100		37,4	62,6
221 (Normal)	96,0	4,0	16,8	83,2	95,6	4,4	100		36,5	63,5
229 (T21)	94,2	5,8	6,0	94,0	97,6	2,4	100		50,5	49,5
235 (T21)	100		1,8	98,2	100		100		51,6	48,4
236 (T21)	100			100	100		100		3,4	96,6
237 (T21)	100		12,8	87,2	100		100		98,9	1,1
238 (Normal)	57,2	42,8	100		50,1	49,9	2,1	97,9	95,9	4,1
240 (Normal)	40,9	59,1	100		57,1	42,9	100		100	

Das 44 amostras incluídas nesse sequenciamento, apenas uma foi não informativa (amostra 172), ou seja, ela foi homozigota para todos os SNPs analisados. O restante das amostras apresentou pelo menos um SNP informativo, até 8 SNPs informativos.

As proporções esperadas para cada genótipo fetal apareceram totalmente discordantes nos resultados dos SNPs, tanto para amostras de fetos normais, como para amostras de fetos com trissomia do cromossomo 21. Nas tabelas 10 e 11, as proporções destacadas em verde são aquelas que representam a proporção de alelos do SNP em concordância com o cariótipo fetal, e as proporções destacadas em amarelo representam as proporções discordantes em relação ao cariótipo fetal.

Como podemos ver nas tabelas 10 e 11, infelizmente nenhuma amostra apresentou somente proporções corretas em relação ao cariótipo fetal, o que

mostra que esses resultados não são confiáveis para determinação do número de cópias do cromossomo 21 fetal através do DNA livre extraído de plasma de gestantes. Suspeitamos que isso ocorreu devido a alta influência do *background* de DNA livre de origem materna.

Como a metodologia proposta aqui para determinação do número de cromossomos 21 fetal através da análise de DNA extraído de plasma de gestante não determinou corretamente o cariótipo de nenhuma das amostras analisadas, não conseguimos fazer uma análise estatística em cima desses resultados, para calcular sensibilidade, especificidade e valores preditivos do teste.

6. Discussão

A análise de DNA livre fetal extraído de líquido amniótico foi muito bem sucedida, todas as amostras foram corretamente identificadas em relação ao cariótipo fetal para o cromossomo 21. As amostras de fetos normais apresentaram razão de alelos de SNPs informativos de aproximadamente 1/1 mostrando que esses fetos possuem duas cópias do cromossomo 21. As amostras de fetos com trissomia do cromossomo 21 apresentaram razão de alelos de SNPs informativos de aproximadamente 2/1 mostrando que esses fetos possuem três cópias do cromossomo 21. Entre as amostras de líquido amniótico analisadas, todas apresentaram pelo menos um SNP informativo, o que possibilitou o cálculo da razão dos alelos para todas. Se alguma não apresentasse SNPs informativos, o resultado do teste seria inconclusivo.

Sendo assim, a metodologia aqui utilizada como padrão ouro se mostra aplicável para a correta identificação da trissomia do cromossomo 21 fetal utilizando amostra de líquido amniótico, apresentando-se como um teste mais rápido e eficiente quando comparado ao cariótipo convencional, que é feito através da cultura e análise do cariótipo das células fetais extraídas geralmente de amostras de líquido amniótico ou de vilosidades coriônicas, por meio de procedimentos invasivos. A análise cromossômica das células cultivadas tem sido considerada uma técnica padrão ouro para o diagnóstico de cromossomopatias. No entanto, esta técnica leva cerca de duas semanas para

ser realizada, devido à necessidade do crescimento do número suficiente de células em cultura, e ao tempo despendido com a análise e interpretação dos resultados.

Como o cariótipo convencional requer o crescimento de células em cultura, esta é uma técnica extremamente demorada e trabalhosa, demandando mão de obra altamente especializada para a análise precisa das células e interpretação dos resultados. Já o teste feito com a metodologia aqui proposta pode ficar pronto em 48 horas, a metodologia é mais simples, barata e algumas etapas podem ser automatizadas, como a extração de DNA. Outra desvantagem do tradicional cariótipo convencional é que podem ocorrer falhas de cultura das células. Das 240 amostras que coletamos nesse estudo, 9 tiveram falha de cultura, tendo que ser coletadas novamente e repetidas, o que gera ansiedade nos pais na espera dos resultados. A gestação é uma época de extrema incerteza e ansiedade para os pais, e qualquer metodologia que consiga fazer com que esse período seja menos estressante é extremamente válida.

A substituição do cariótipo convencional por exames mais rápidos e que não requerem crescimento de células em cultura, os quais se utilizam de métodos moleculares para a contagem de cromossomos, como o QF-PCR (*Quantitative Fluorescent-PCR*), já aconteceu desde o início dos anos 2000 no Reino Unido e em outros locais do mundo (Mann et al., 2001). Esse método é

simples, barato e rápido (resultados disponíveis após 48 horas após a coleta). Em nosso serviço, ainda utilizamos o cariótipo convencional em amostras coletadas de procedimentos invasivos, e estamos ficando ultrapassados quando comparados a outros países. Ao invés de implantarmos o QF-PCR em nosso serviço como método alternativo mais rápido, poderíamos implantar o teste com a metodologia aqui proposta de sequenciamento de SNPs no Ion Torrent, a qual possui as vantagens de simplicidade de análise e a capacidade de analisar múltiplas amostras em uma mesma corrida.

Infelizmente a metodologia não invasiva de detecção de trissomia do cromossomo 21 fetal aqui proposta não se mostrou eficiente para esse propósito. Esperávamos encontrar resultados baseados em frações fetais de DNA livre de 5% a 10%, mas os resultados que encontramos diferem dos esperados. Imaginamos que isso ocorreu por causa de variações nessas frações fetais, uma vez que não padronizamos metodologia para estimá-la com precisão. Uma possível saída para aumentar a precisão do teste seria aumentar a cobertura dos fragmentos no sequenciamento no Ion Torrent (Life Technologies), o que poderia ser feito com a utilização de chips maiores, ou de menor quantidade de amostras por chip.

Tentamos trabalhar com a metodologia de sequenciamento de semicondutores Ion Torrent por ser uma tecnologia mais simples, menos trabalhosa, e que demanda menos tempo e custo para ser realizada.

Um trabalho realizado por um grupo chinês demonstrou a viabilidade do uso do sequenciador Ion Torrent na detecção de aneuploidias fetais, utilizando apenas uma amostra por chip na corrida de sequenciamento, um chip maior (318) e analisando todos os cromossomos fetais através do método estatístico T pós correção de viés de GC (Yuan et al., 2012), e não baseado na razão de alelos de SNPs, como fizemos em nosso trabalho. Porém, esta análise torna o teste muito mais caro, e por este motivo não foi a nossa opção de desenvolvimento.

Seria uma grande vantagem aumentar a qualidade e rapidez dos testes realizados em amostras fetais obtidas de procedimentos invasivos, uma vez que os testes baseados em metodologias não invasivas para detecção de aneuploidias fetais são testes de triagem, e não o diagnóstico definitivo. Quando os resultados destes testes de triagem são positivos, os casais são indicados a fazerem o procedimento invasivo para confirmação definitiva da aneuploidia fetal, pois baixas frações fetais podem gerar resultados falso-positivos e alguns resultados positivos nos exames não invasivos acabam sendo discordantes com o desfecho normal da gestação (feto com cariótipo normal) (Snyder et al., 2016).

Os resultados discordantes podem ser devidos a diferenças entre o padrão genético da placenta e do feto (mosaicismo confinado a placenta) (Choi et al., 2013), DNA livre fetal residual proveniente do *vanishing twin*

(Curnow et al., 2015) ou *copy number variation* materno (Snyder et al., 2015; Flowers et al., 2015). Sendo assim, nossa esperança com esse trabalho é fornecer um teste alternativo que pode ser realizado em amostras coletadas de procedimentos invasivos, que é mais rápido, barato e menos trabalhoso que os métodos convencionais ainda utilizados na rotina do nosso serviço. Ao mesmo tempo, aumentar a cobertura da sequência e o aprimoramento do algoritmo de análise poderá permitir a aplicação clínica do teste pela amostra de plasma materno.

7. Conclusão

Conseguimos padronizar a metodologia de quantificação de alelos de SNPs localizados em genes do cromossomo 21, para estimar o número de cromossomos 21 presentes em amostras de líquido amniótico. Foi possível fazer, com sucesso, a detecção e quantificação, no líquido amniótico, dos SNPs que fazem parte do painel previamente descrito durante o projeto de mestrado, em todas as amostras de líquido amniótico analisadas, distinguindo claramente todas as amostras de fetos normais, das amostras de fetos com trissomia do cromossomo 21.

Infelizmente, ao aplicar a metodologia padronizada no líquido amniótico ao plasma de gestantes, não foi possível fazer a distinção entre fetos normais e fetos com trissomia do cromossomo 21, possivelmente devido às variações na fração fetal do DNA livre em relação à fração materna.

Como nosso objetivo principal não foi alcançado, propomos aqui que o teste realizado em líquido amniótico seja utilizado como uma alternativa mais simples, rápida e barata ao cariótipo convencional atualmente utilizado para fazer o diagnóstico da trissomia do cromossomo 21 em amostras coletadas por procedimentos invasivos, enquanto as deficiências do teste não-invasivo pelo plasma materno são aprimoradas.

8. Anexos

8.1 Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

---

1. NOME: .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: ☐ M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: ..... SEXO: ☐ M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : "Investigação dos polimorfismos do gene PLAC4 para avaliação de potencial teste diagnóstico da Trissomia do 21 fetal em plasma de gestantes"

PESQUISADOR : Mário Henrique Burlacchini de Carvalho

CARGO/FUNÇÃO: Médico Assistente   INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL N 80872

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Obstetria e Ginecologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒   RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐   RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

O objetivo deste estudo é identificar um gene no cromossomo 21, visando detectar a Síndrome de Down, conhecido como mongolismo, em seu bebê através de um exame de sangue. Será feita a análise do DNA do seu bebê que está presente em seu sangue, e líquido amniótico colhido pelo médico assistente após consulta médica onde foram discutidos os riscos do procedimento invasivo, através de exames de biologia molecular que detectam o gene PLAC4. O número de genes PLAC4 encontrados em seu sangue está relacionado com o mongolismo (se forem encontrados 2 genes PLAC4 significa que o bebê é normal, se forem encontrados 3 genes PLAC4 significa que o bebê tem mongolismo). Para a pesquisa teremos que colher cerca de 10mL de sangue da veia do seu braço. Quando for indicada a realização de amniocentese (punção da bolsa com uma agulha fina guiada pelo ultra-som) por seu médico, são coletados cerca de 20 mL de líquido amniótico dos quais apenas 1mL será cedido à pesquisa. A retirada de 10mL do seu sangue será feita como é feito os outros exames de pré-natal, por punção com agulha e seringa. A amniocentese (coleta de líquido da bolsa) será feita com agulha bem fina, guiada pelo ultra-som, sempre com o cuidado de não atingir seu bebê. A coleta do sangue da sua veia pode causar um pouco de dor na punção e às vezes pode ficar um pouco roxo. A coleta do líquido amniótico tem um pequeno risco de perda da gestação (em torno, de 1%), no entanto, este risco não está aumentado por causa da pesquisa, e sim o risco é do próprio procedimento. O seu sangue será analisado no laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da USP (IMT-USP), através de exames de biologia molecular (PCR convencional e PCR em tempo real). O líquido amniótico será enviado conforme rotina da Clínica Obstétrica para o Laboratório Central do Hospital as Clínicas, onde será realizado o cariótipo fetal. Se você autorizar, as amostras ficarão armazenadas no Banco de DNA/RNA do laboratório de Virologia do IMT-USP, que será criado com esta pesquisa sob a responsabilidade do Dr. José Eduardo Levi.

Você não receberá qualquer pagamento por sua participação, portanto, a sua participação neste estudo é voluntária. Não será cobrada nenhuma taxa e você não terá que fazer nenhum pagamento por participar da pesquisa ou mesmo se vier a desistir dela. Caso seja de seu interesse tomar conhecimento dos resultados dos testes, disponibilizaremos os resultados após a análise. Será oferecido a você um plano de aconselhamento genético e acompanhamento clínico, realizado pelo Dr. Edécio Ambruster de Moraes e Dr. Mário Henrique Burlacchini de Carvalho. Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento do estudo, sem penalidade ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico na Clínica Obstétrica. Caso você desista de participar da pesquisa, poderá solicitar a retirada de seus dados genéticos armazenados no Banco de DNA/RNA.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante poderá requerer seus direitos estabelecidos pela legislação brasileira.

Os dados e os resultados obtidos durante a pesquisa serão confidenciais e somente serão revelados a terceiros se você autorizar previamente. Sua identidade será mantida em segredo quando os resultados deste estudo forem publicados em artigos de revistas científicas, ou forem apresentados em temas de aulas e debates. Os dados genéticos armazenados no Banco de DNA/RNA só poderão ser utilizados novamente

mediante a elaboração de novo protocolo de pesquisa com autorização prévia da Comissão de Ética, e você será contatada novamente para conceder ou não autorização para o uso do material em futuros projetos.

Caso você tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, ou se tiver alguma lesão ou doença relacionada à pesquisa, você poderá entrar em contato com Dr. Mário Henrique Carvalho (tel: 3069 6380) ou com a pesquisadora Renata Moscolini Romão (tel: 8023 6926)

Eu, _____ declaro que, após bem esclarecida pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito, voluntariamente, em participar desta Pesquisa.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br;

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Investigação dos polimorfismos do gene PLAC4 para avaliação de potencial teste diagnóstico da Trissomia do 21 fetal em plasma de gestantes".

Eu discuti com o Dr. Mário Henrique e/ou a pesquisadora Renata sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

_____
Assinatura do paciente/representante legal   Data ____ / ____ / ____

_____
Assinatura da testemunha   Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____
assinatura do responsável pelo estudo   Data ____ / ____ / ____

8.2 Anexo 2 - Aprovação CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/03/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0789/08**, intitulado: "**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE PLAC4 NA POPULAÇÃO BRASILEIRA.**" apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Mário Henrique Burlacchini de Carvalho**

Pesquisador (a) Executante: **Renata Moscolini Romão**

CAPPesq, 26 de Março de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

8.3 Anexo 3 – Aprovação CEP IMT-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174

São Paulo, 24 de novembro de 2008.

Ilmo (a)

Prof. Dr. Mario Henrique Burlacchini

Em reunião na presente data, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em Pesquisa, o projeto classificado sob o número 033/08, intitulado "Investigação dos polimorfismos do gene PLAC4 para avaliação de potencial teste diagnóstico da Trissomia do 21 fetal em plasma de gestantes", sob a responsabilidade e orientação do Dr Mario Henrique Burlacchini

Atenciosamente

Dra. Eufrosina Setsu Umezawa
Coordenadora do CEP-IMT

Dra. Eufrosina Setsu Umezawa
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa
IMTSP-USP

9. Referências Bibliográficas*

Agarwal A, Sayres LC, Cho MK, Cook-Deegan R, Chandrasekharan S. Commercial landscape of noninvasive prenatal testing in the United States. *Prenat Diagn.* 2013;33(6):521-31.

Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, Soothill PW: Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn.* 2007;27:415-418.

Allyse M, Minear MA, Berson E, Sridhar S, Rote M, Hung A, Chandrasekharan S. Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges. *Int J Womens Health.* 2015;7: 113–126.

Alkan C, Kidd JM, Marques-Bonet T, Aksay G, Antonacci F, et al. Personalized copy number and segmental duplication maps using next-generation sequencing. *Nature Genetics.* 2009;41: 1061–1067.

Ashoor G, Syngelaki A, Wange E, et al. Trisomy 13 detection in the first trimester of pregnancy using a chromosome-selective cell-free DNA analysis method. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41(1):21-25.

---

* De acordo com:

Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus

Ashoor G, Poon L, Syngelaki A, Mosimann B, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11–13 weeks' gestation: Effect of maternal and fetal factors. *Fetal Diagnosis and Therapy*. 2012a;31: 237–243.

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*. 2012b;206(4):322.e1-5.

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;41:26–32

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

Benn PA, Egan JF, Fang M, Smith-Bindman R. Changes in the utilization of prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol*. 2004;103:1255–1260.

Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol*. 2012;119(5):890-901.

Chan KCA, Zhang J, Hui ABY, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *ClinChem*. 2004;50:88–92.

Chandrananda D, Thorne NP, Ganesamoorthy D, Bruno DL, Benjamini Y, Speed TP, Slater HR, Bahlo M. Investigating and correcting plasma DNA sequencing coverage bias to enhance aneuploidy discovery. *PLoS One*. 2014;29;9(1):e86993.

Chandrasekharan S, Minear MA, Hung A, Allyse M. Noninvasive prenatal testing goes global. *Sci Transl Med*. 2014;6(231):231fs15.

Chen EZ, Chiu RW, Sun H, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. *PLoS ONE*. 2011;6(7):e21791.

Chen S, Lau TK, Zhang C, Xu C, Xu Z, Hu P, Xu J, HuangH, Pan L, Jiang F, Chen F, Pan X, XieW, Liu P, Li X, Zhang L, Li S, Li Y, Xu X, Wang W, Wang J, Jiang H, Zhang X. A method for noninvasive detection of fetal large deletions/duplications by low coverage massively parallel sequencing. *Prenat Diagn*. 2013;33: 584–590.

Chim SSC, Tong YK, Chiu RWK, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:14753–8.

Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ*. 2011;342:c7401.

Chiu RW, Chan KC, Gao Y, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(51):20458-20463.

Chiu RW, Lui WB, Cheung MC, Kumta N, Farina A, Banzola I, Grotti S, Rizzo N, Haines CJ, Lo YM: Time profile of appearance and disappearance of circulating placenta-derived mRNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2006;52:313-316.

Choi H, Lau TK, Jiang FM, et al. Fetal aneuploidy screening by maternal plasma DNA sequencing: 'false positive' due to confined placental mosaicism. *Prenat Diagn*. 2013;33(2):198–200

Cuckle H, Benn P. Multianalyte maternal serum screening for chromosomal defects. In *Genetic Disorders and the Fetus: Diagnosis, Prevention and Treatment* (6th edn), Milunsky A, Milunsky JM (eds). *Wiley-Blackwell, Chichester, UK*. 2010;771–818.

Curnow KJ, Wilkins-Haug L, Ryan A, et al. Detection of triploid, molar, and vanishing twin pregnancies by a single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;212(1):79 e1–9.

Dan S, Wang W, Ren J, Li Y, Hu H, Xu Z, Lau TK, Xie J, Zhao W, et al. Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal

noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11,105 pregnancies with mixed risk factors. *Prenat Diagn.* 2012;32(13):1225-32.

Dar P, Curnow KJ, Gross SJ, Hall MP, Stosic M, Demko Z, Zimmermann B, Hill M, Sigurjonsson S, Ryan A, Banjevic M, Kolacki PL, Koch SW, Strom CM, Rabinowitz M, Benn P. Clinical experience and follow-up with large scale single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal aneuploidy testing. *Am J Obstet Gynecol.* 2014;pii: S0002-9378(14)00818-7.

Deng YH, Yin AH, He Q, Chen JC, He YS, Wang HQ, Li M, Chen HY. Non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21 by reverse transcriptase multiplex ligation-dependent *probe* amplification. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(4):641-6.

Du Y, Zhang J, Wang H, Yan X, Yang Y, Yang L, Luo X, Chen Y, Duan T, Ma D: Hypomethylated DSCR4 is a placenta-derived epigenetic marker for trisomy 21. *Prenat Diagn.* 2011;31(2):207-14.

Fairbrother G, Johnson S, Musci TJ, Song K. Clinical experience of noninvasive prenatal testing with cell-free DNA for fetal trisomies 21, 18, and 13, in a general screening population. *Prenat Diagn.* 2013;33(6):580-3.

Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing. *Clinical Chemistry.* 2010;56: 1279–1286.

Ferguson-Smith MA, Yates JRW. Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative European study on 52965 amniocenteses. *Prenat Diagn.* 1984;4 Spec No: 5–44.

Finning K, Martin P, Daniels G. A clinical service in the UK to predict fetal Rh (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma. *Ann N Y Acad.* 2004;1022:119-23.

Fiorentino F, Bono S, Pizzuti F, et al. The importance of determining the limit of detection of non invasive prenatal testing methods. *Prenat Diagn.* 2016;Jan 27 (Epub ahead of print)

Flori E, Doray B, Gautier E, Kohler M, Ernault P, Flori J, Costa JM: Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytio-trophoblastic cells. Case report. *Hum Reprod.* 2004;19:723-724.

Flowers N, Kelley J, Sigurjonsson S, et al. Maternal mosaicism for a large segmental duplication of 18q as a secondary finding following noninvasive prenatal testing and implications for test accuracy. *Prenat Diagn.* 2015;35(10):986–9.

Futch T, Spinoso J, Bhatt S, de Feo E, Rava RP, Sehnert AJ. Initial clinical laboratory experience in noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidy from maternal plasma DNA samples. *Prenat Diagn.* 2013;33(6):569-74.

Go AT, Visser A, Betsalel OT, van Vugt JM, Blankenstein MA, Oudejans CB. Measurement of allelic-expression ratios in trisomy 21 placentas by quencher extension of heterozygous samples identified by partially denaturing HPLC. *Clin Chem*. 2008;54(2):437-40.

Go AT, Visser A, Mulders MA, Twisk JW, Blankenstein MA, van Vugt JM, Oudejans CB. C21ORF105, A chromosome 21-encoded mRNA, is not a discriminative marker gene for prediction of Down syndrome in maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2007;27(2):146-9.

Guibert J, Benachi A, Grebille AG, Ernault P, Zorn JR, Costa JM. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Reprod*. 2003;18:1733–6.

Guo X, Bayliss P, Damewood M, et al. A noninvasive test to determine paternity in pregnancy. *N Engl J Med*. 2012;366:1743–5.

Haghiac M, Vora NL, Basu S, Johnson KL, Presley L, Bianchi DW, Mouzon SH. Increased death of adipose cells, a path to release cell-free DNA into systemic circulation of obese women. *Obesity (Silver Spring)*. 2012;20(11):2213-9.

Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z: Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res*. 2000;260:248-256.

Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, et al. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*. 2000;405:311–9.

Hill M, Finning K, Martin P, et al. Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice. *Clin Genet*. 2011;80:68–75.

Hill M, Lewis C, Jenkins L, Allen S, Elles RG, Chitty LS. Implementing noninvasive prenatal fetal sex determination using cell-free fetal DNA in the United Kingdom. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12:S119–26.

Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;186:158-166.

Jiang F, Ren J, Chen F, Zhou Y, Xie J, Dan S, Su Y, Xie J, et al.. Noninvasive Fetal Trisomy (NIFTY) test: an advanced noninvasive prenatal diagnosis methodology for fetal autosomal and sex chromosomal aneuploidies. *BMC Med Genomics*. 2012;5: 57.

Jiang K. Competition intensifies over market for DNA-based prenatal tests. *Nature Medicine*. 2013;online post
(<http://blogs.nature.com/spoonful/2013/02/competition-intensifies-over-market-for-dna-based-prenatal-tests.html>)

Jimbo M, Sekizawa A, Sugito Y, Matsuoka R, Ichizuka K, Saito H, Okai T: Placenta increta: Postpartum monitoring of plasma cell-free fetal DNA. *Clin Chem*. 2003;49:1540-1541.

Lapaire O, Volgmann T, Grill S, Hösli I, Zanetti-Daellenbach R, Zhong XY, Holzgreve W. Significant correlation between maternal body mass index at delivery and in the second trimester, and second trimester circulating total cell-free DNA levels. *Reprod Sci*. 2009;16(3):274-9.

Lau TK, Chen F, Pan X, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of common fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma DNA sequencing. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012;25(8):1370-1374.

Lau TK, Cheung SW, Lo PS, Pursley AN, Chan MK, Jiang F, Zhang H, Wang W, Jong LF, Yuen OK, Chan HY, Chan WS, Choy KW. Non-invasive prenatal testing for fetal chromosomal abnormalities by low-coverage whole-genome sequencing of maternal plasma DNA: review of 1982 consecutive cases in a single center. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014;43: 254–264.

Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ: Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977;37:646-650.

Levy B & Norwitz E. Non-invasive prenatal aneuploidy testing: technologies and clinical implications. *Medical laboratory Observer*. 2013;Online Article.

(<http://www.mlo-online.com/articles/201306/non-invasive-prenatal-aneuploidy-testing-technologies-and-clinical-implications.php>).

Levy B, Hill M, Zimmermann B, et al. Massively multiplexed targeted amplification and sequencing of SNPs as a method for identifying fetal chromosome disorders from cell-free DNA in maternal plasma. *Presented at: American College of Medical Genetics Meeting*; March 19-23, 2013; Phoenix, AZ.

Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem*. 2004;50(6):1002-11.

Liao GJ, Gronowski AM, Zhao Z. Non-invasive prenatal testing using cell-free fetal DNA in maternal circulation. *Clin Chim Acta*. 2014;20;428:44-50.

Lim JH, Lee da E, Kim KS, Kim HJ, Lee BY, Park SY, Ahn HK, Lee SW, Kim MY, Ryu HM. Non-invasive detection of fetal trisomy 21 using fetal epigenetic biomarkers with a high CpG density. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(5):641-7.

Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS: Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997;350:485-487.

Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM: Quantitative analysis of fetal DNA in

maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis.

Am J Hum Genet. 1998;62:768-775.

Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Heung MM, Gerovassili A, Jin Y, Nicolaides KH, Cantor CR, Ding C: Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med.* 2007;13:218-223.

Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, Zheng YW, Leung TY, Lau TK, Cantor CR, Chiu RW. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med.* 2010;8;2(61):61.

Lui YY, Chik KW, Chiu RW, Ho CY, Lam CW, Lo YM: Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem.* 2002;48:421-427.

Malone FD, Canick JA, Ball RH, et al. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. *N Engl J Med.* 2005;353:2001–11.

Mandel P, Metais P: Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948;142:241-243.

Mann K, Fox SP, Abbs SJ, Yau SC, Scriven PN, Docherty Z, Ogilvie CM. Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic

service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. *Lancet*. 2001;29;358(9287):1057-61.

Masuzaki H, Miura K, Yoshiura K, Yoshimura S, Niikawa N, Ishimaru T. Detection of cell free placental DNA in maternal plasma: direct evidence from three cases of confined placental mosaicism. *J Med Genet*. 2004;41:289–92.

Morris S, Karlsen S, Chung N, Hill M, Chitty LS. Model-based analysis of costs and outcomes of non-invasive prenatal testing for Down's syndrome using cell free fetal DNA in the UK National Health Service. *PLoS One*. 2014;9(4):e93559.

Mujezinovic F, Alfrevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol*. 2007;110:687–94.

Ng EK, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW, Panesar NS, Lit LC, Chan KW, Lo YM: mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:4748-4753.

Nicolaides KH, Syngelaki A, Gil M, Atanasova V, Markova D. Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn*. 2013;33(6):575-9.

Norton ME, Brar H, Weiss J, 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.

Nygren AOH, Dean J, Jensen TJ, Kruse S, Kwong W. Quantification of fetal DNA by use of methylation-based DNA discrimination. *Clin Chem.* 2010;**56**:1627–35.

Orozco AF, Bischoff FZ, Horne C, Popek E, Simpson JL, Lewis DE: Hypoxia-induced membrane-bound apoptotic DNA particles: potential mechanism of fetal DNA in maternal plasma. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1075:57-62.

Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med.* 2011;13:913-920.

Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM: Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2000;46:1832-1834.

Poon LLM, Leung TN, Lau TK, Chow KCK, Lo YMD. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2002;48(1):35–41.

Rava RP, Srinivasan A, Sehnert AJ, Bianchi DW. Circulating fetal cell-free DNA fractions differ in autosomal aneuploidies and monosomy X. *Clin Chem*. 2014;60(1):243-50.

Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C: Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*. 1993;14:131-136 Sci 2004;1022:119–23.

Schlütter JM, Hatt L, Bach C, Kirkegaard I, Kølvrå S, Uldbjerg N. The cell-free fetal DNA fraction in maternal blood decreases after physical activity. *Prenat Diagn*. 2014;34(4):341-4.

Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Sugito Y, Yukimoto Y, Otsuka J, Okai T: Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem*. 2002;48:353-354.

Smith SC, Baker PN: Placental apoptosis is increased in post-term pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*. 1999;106:861-862.

Snyder MW, Simmons LE, Kitzman JO, et al. Copy-number variation and false positive prenatal aneuploidy screening results. *N Engl J Med*. 2015;372(17):1639–45.

Snyder HL, Curnow KJ, Bhatt S, Bianchi DW. Follow-up of multiple aneuploidies and single monosomies detected by noninvasive prenatal testing: implications for management and counseling. *Prenat Diagn*. 2016;36(3):203-9.

Sparks AB, Wang ET, Struble CA, et al. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn.* 2012a;32(1):3-9.

Sparks ABb, Struble CA, et al. Non-invasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol.* 2012b;206:319.e1–9.

Straver R, Oudejans CB, Sistermans EA, Reinders MJ. Calculating the fetal fraction for Non Invasive Prenatal Testing based on Genome-wide nucleosome profiles. *Prenat Diagn.* 2016;Epub ahead of print.

Suzumori N, Ebara T, Yamada T, Samura O, Yotsumoto J, et al. Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma is affected by fetal trisomy. *J Hum Genet.* 2016;Epub ahead of print.

Syngelaki A, Chelemen T, Dagklis T, Allan L, Nicolaides KH. Challenges in the diagnosis of fetal non-chromosomal abnormalities at 11–13 weeks. *Prenat Diagn.* 2011;31: 90–102.

Szerlong HJ, Hansen JC. Nucleosome distribution and linker DNA: connecting nuclear function to dynamic chromatin structure. *Bioch and Cell Biol.* 2011;89: 24–34.

Tabor A, Alfievic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal Diagn Ther.* 2010;27:1–7.

Tong YK, Ding C, Chiu RWK, et al. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: theoretical and empirical considerations. *Clin Chem*. 2006;52(12):2194–2202.

Tsui NB, Dennis Lo YM: Placental RNA in maternal plasma: toward noninvasive fetal gene expression profiling, *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1075:96-102.

Tsui NB, Wong BC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM: Non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP allelic ratio analysis using maternal plasma SERPINB2 mRNA: a feasibility study. *Prenat Diagn*. 2009;29:1031-1037.

Tsui NB, Wong CS, Chow KC, Lo ES, Cheng YK. Investigation of biological factors influencing the placental mRNA profile in maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2014;34(3):251-8.

Wagner J, Dzijan S, Marjanovic D, Lauc G. Non-invasive prenatal paternity testing from maternal blood. *Int J Legal Med*. 2009;123:75–9.

Yang L, Sun H, Chen D, Lu M, Wang J, Xu F, Hu L, Xiao J. Application of multiplex SNaPshot assay in measurement of PLAC4 RNA-SNP allelic ratio for noninvasive prenatal detection of trisomy 21. *Prenat Diagn*. 2014;34(2):139-44.

Yu SC, Lee SW, Jiang P, et al. High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clin Chem*. 2013;59:1228–37.

Yuan Y, Jiang F, Hua S, Du B, Hao Y, Ye L, Liu J, et al. Feasibility study of semiconductor sequencing for noninvasive prenatal detection of aneuploidy. *Clin Chem*. 2013;59(5):846-9.

Zhang Y, Liu H, Chen X, Xie X, Liu S, Wang H. Noninvasive prenatal diagnosis of Down syndrome in samples from Southwest Chinese gravidas using pregnant plasma placental RNA allelic ratio. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012;16(9):1051-7.

Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA: Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? *Cancer Treat Rev*. 2002;28:255-271.

Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, et al. Noninvasive prenatal aneuploidy testing at chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing at polymorphic loci. *Prenat Diagn*. 2012;32(13):1233-1241.