Renata Wendel de Moraes

Validação de teste de reação em cadeia da polimerase fluorescente
quantitativa (QF-PCR) para detecção de aneuploidias fetais

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre 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

Moraes, Renata Wendel de

Validação de teste de reação em cadeia da polimerase fluorescente
quantitativa (QF-PCR) para detecção de aneuploidias fetais / Renata Wendel de
Moraes. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Mário Henrique Burlacchini de Carvalho.

Descritores: 1.Diagnóstico pré-natal 2.Aneuploidia 3.Instabilidade cromossômica
4.Aberrações cromossômicas 5.Fluorescência 6.Reação em cadeia da polimerase

USP/FM/DBD-405/16

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. Mário Henrique Burlacchini de Carvalho, pela motivação, orientação e confiança na realização desse estudo.

Ao Dr. José Eduardo Levi, pela ideia do projeto, pela dedicação, pelos ensinamentos adquiridos, disposição e apoio.

À Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino, diretora do Instituto de Medicina Tropical, por permitir a realização deste trabalho no Laboratório de Virologia do IMT-USP. A toda equipe do Laboratório de Virologia, funcionários e amigos, pela contribuição e auxílio.

Aos membros do programa de pós-graduação em Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Edmund Chada Baracat, coordenador, Profa. Dra. Rossana Pulcineli Vieira Francisco, vice coordenadora do programa, e à Lucinda Cristina Pereira, secretária da pós-graduação. Agradeço a oportunidade de realização do trabalho e o apoio sempre que necessário.

À Suzete Cleusa Lombardi, Anna Nyshiya e Antônio Lancha Ruiz pelo auxílio na parte laboratorial do estudo, pelos ensinamentos, pela disposição e orientação.

Aos membros da minha banca de qualificação – Profa. Dra. Maria de Lourdes Brizot, Dra. Lisandra Stein Bernardes Ciampi de Andrade e Dr. Edécio Armbruster de Moraes – pelas contribuições e sugestões de suma importância para a finalização do estudo.

À Renata Moscolini Romão, pela coleta das amostras, por estar sempre disponível para me ensinar, tirar minhas dúvidas e me mostrar o bê-á-bá do laboratório. Obrigada pela

dedicação e pela amizade construída, a cada dia mais eu te admiro como pessoa e como profissional.

A todos os funcionários da Clínica Obstétrica pela colaboração e coleta das amostras.

À FAPESP pelo auxílio pesquisa vinculado ao PPSUS e a CAPES pela bolsa de mestrado cedida.

Às gestantes que participaram voluntariamente do projeto e cederam as amostras.

À Profa. Dra. Débora Aparecida Rodrigueiro que é minha inspiração como professora, bióloga, pessoa e agora mãe. Você tem marcação epigenética na minha vida. Obrigada por tudo!

À minha querida amiga e revisora dessa dissertação Cláudia Tisi. Muito obrigada pelo companheirismo do dia-a-dia, pela doçura dos momentos compartilhados e por ser essa pessoa incrível, solícita e guerreira.

Aos meus amigos que me aconselharam em momentos de dúvidas, que me ouviram quando eu precisava desabafar e vibraram em cada etapa dessa conquista.

Aos meus alunos queridos que colocam seu ensino em minhas mãos. Vocês me dão força para nunca deixar de lecionar.

Ao meu namorado, Arthur Felipe Steiner, por aguentar meus finais de semana dedicados ao estudo e elaboração dessa dissertação. Por sempre estar por perto quando eu preciso e principalmente por me incentivar e me apoiar em cada decisão. Que possamos crescer juntos cada dia mais.

E por fim, um agradecimento especial a minha família! Aos meus irmãos, Paulo e Arthur, por compartilharem o DNA e os momentos traquinas. Aos meus tios, Lucas, Paulo,

Fernando e César por serem a mão e o colo amigo sempre que precisei. À minha avó Letícia, por todo o carinho recebido e por ser minha fonte de inspiração em tudo que faço. Aos meus pais, Silvio e Márcia, que me deram a vida, dádiva essa que, de tão especial, escolhi me aprofundar e estudar. Sem vocês nada teria sentido. Obrigada pelo amor e incentivo incondicionais.

***“O amor por todas as coisas vivas,
é o mais nobre atributo de um homem.”***

Charles Darwin

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos 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*.

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Resumo

Abstract

1. Introdução	20
2. Revisão de Literatura.....	26
2.1. Métodos laboratoriais de detecção de aneuploidias.....	26
2.1.1. Citogenética clássica	26
2.1.2. Genética molecular.....	28
2.2. Comparação QF-PCR e cariótipo	31
3. Objetivo.....	39
4. Casuística e Métodos	41
4.1 Casuística.....	41
4.2 Métodos.....	43
4.2.1 Coleta e processamento das amostras de líquido amniótico	43
4.2.2 Extração de DNA genômico	43
4.2.3 Determinação da concentração e pureza do DNA extraído.....	44
4.2.4. Amplificação QF-PCR	44
4.2.5. Análise dos fragmentos em Sequenciador Capilar	45
4.2.6. Análise Molecular	46
5. Resultados	49
5.1. Caracterização da população	49
5.2. Resultado amostral	50
6. Discussão	60

7. Conclusão	68
8. Anexos.....	70
8.1 –Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	70
8.2 – Anexo B - Aprovação na CAPpesq.....	73
9. Referências Bibliográficas.....	75

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustração dos quatro resultados possíveis para cada marcador do QF-PCR. Dissomia (presença de dois picos de mesmo tamanho), trissomia (presença de três picos de mesmo tamanho ou dois picos com tamanho de proporção 2:1) e não informativo (presença de apenas um pico). (Adaptado de Mann *et. al.* 2012).....30

Figura 2. Representação gráfica da distribuição das raças ou cor das gestantes voluntárias do estudo “Validação do teste reação em cadeia da polimerase fluorescente quantitativa (QF-PCR) para a detecção de aneuploidias fetais” realizado na cidade de São Paulo, no período de outubro de 2013 a outubro de 2016.....49

Figura 3. Amostra 1 – 46, XY. Eletroferograma mostrando os marcadores para os cromossomos X, Y e 21. Padrão heterozigótico (em vermelho) 1:1 para os marcadores D21S144, X22, D21S1435, D21S1409, D21S11. Padrão homozigótico, não-informativo, para os marcadores DXS6854, DXS6803, D21S1246, D21S1411. Sexo masculino confirmado pela presença do SRY.....52

Figura 4. Amostra 1 – 46, XY. Eletroferograma mostrando os marcadores para os cromossomos 13, 18, X e Y. Padrão heterozigótico (em vermelho) 1:1 para os marcadores D13S797, DXYS218, D13S634, D18S535, AMEL, D13S742, D18S386, D13S305, D18S976 e D13S628. Padrão homozigótico, não-informativo para os marcadores XHPRT, D18S391, D18S819 e D18S390.....53

Figura 5. . Amostra 17 – 47, XY +13. Eletroferograma mostrando os marcadores para os cromossomos 13, 18, X e Y. Padrão trissômico (em vermelho) 2:1 para os marcadores D13S797, D13S305 e D13S628. Padrão trissômico (em vermelho) 1:1:1 para os marcadores D13S634 e D13S742. Padrão heterozigótico 1:1 para os marcadores DXYS218, D18S391, AMEL, D18S976 D18S819 e D18S390. Padrão homozigótico, não-informativo, para os marcadores XHPRT, D18S535 e D18S386....53

Figura 6. Amostra 37 – 45, X. Eletroferograma mostrando os marcadores para os cromossomos X, Y e 21. Padrão heterozigótico 1:1 para os marcadores D21S1246, D21S1435, e D21S11. Padrão homozigótico (em vermelho), não-informativo para os marcadores DXS6854, , DXS6803, X22. Padrão homozigótico, não-informativo para os marcadores D21S1444, , D21S1409 e D21S141. . Sexo feminino confirmado pela ausência do SRY.54

Figura 7. Amostra 37 – 45, X. Eletroferograma mostrando os marcadores para os cromossomos 13, 18, X e Y. Padrão heterozigótico 1:1 para os marcadores D13S634, D13S535, D18S391, D13S742, D18S386, D18S305, D18S976, D18S819 e D13S628. Padrão homozigótico (em vermelho), não-informativo, para os marcadores XHPRT, DXYS218, AMEL. Padrão homozigótico, não-informativo, para os marcadores D13S797, D18S39054

Figura 8. Amostra 38 – 47, XX +21. Eletroferograma mostrando os marcadores para os cromossomos X, Y e 21. Padrão trissômico (em vermelho) 2:1 para os marcadores

D21S1246, D21S1435, D21S1409 e D21S1411. Padrão trissômico (em vermelho) 1:1:1 para os marcadores D21S1444, D21S11. Padrão heterozigótico 1:1 para o marcador DXS6803. Padrão homozigótico, não-informativo para os marcadores DXS6854 e X22. Sexo feminino confirmado pela ausência do SRY.....55

Figura 9. Amostra 70 – 47, XY +18. Eletroferograma mostrando os marcadores para os cromossomos 13, 18, X e Y. Padrão trissômico (em vermelho) 2:1 para os marcadores D18S535, D18S391. Padrão trissômico (em vermelho) 1:1:1 para os marcadores D18S390. Padrão heterozigótico 1:1 para os marcadores D13S797, DXYS218, AMEL, D13S742, D18S386 e D13S628. Padrão homozigótico, não-informativo, para os marcadores XHPRT, D13S634, D13S305, D18S976 e D18S819.....55

Figura 10. Amostra 5 – 69, XXY. Eletroferograma mostrando os marcadores para os cromossomos X, Y e 21. Padrão heterozigótico 1:1 para os marcadores DXS6854 e DXS6803. Padrão trissômico (em vermelho) 2:1 para os marcadores X22, D21S1246, D21S1435, D21S1409 e D21S11. Padrão trissômico (em vermelho) 1:1:1 para os marcadores D21S1444 e D21S1411. Sexo masculino confirmado pela presença do SRY.....56

Figura 11. Amostra 5 – 69, XXY. Eletroferograma mostrando os marcadores para os cromossomos 13, 18, X e Y. Padrão trissômico (em vermelho) 2:1 para os marcadores D13S797, DXYS218, D13S634, AMEL, D18S391, D13S742, D18S386, D13S305 e D13S628. Padrão trissômico (em vermelho) 1:1:1 para o marcador D18S535. Padrão heterozigótico 1:1 para o marcador XHPRT e D18S976. Padrão homozigótico, não-informativo, para os marcadores D18S390 e D18S819. Sexo masculino confirmado pela presença do SRY.....56

Lista de Tabelas

Tabela 1. Descrição das especificações da eletroforese por capilaridade em sequenciador ABI 3130 de acordo com o protocolo do kit ChromoQuant QF-PCR (311.003-52)	45
Tabela 2. Relação dos marcadores fluorescentes para os cromossomos X, Y e 21 presentes no kit CromoQuant QF-PCR v.3 (Cybergene AB) (311.003-52) – Mix Azul.....	46
Tabela 3. Relação dos marcadores fluorescentes para os cromossomos X, Y, 13 e 18 presentes no kit CromoQuant QF-PCR v.3 (Cybergene AB) (311.003-52) – Mix Branco.....	46
Tabela 4. Resultado citogenético das amostras de líquido amniótico fetal extraídas de gestantes com risco aumentado para feto aneuploide, São Paulo, HC-FMUSP.....	50
Tabela 5. Comparação dos resultados obtidos pela citogenética e pelo teste QF-PCR em amostras de líquido amniótico extraídas de gestantes com risco aumentado para feto aneuploide, São Paulo, HC-FMUSP.....	51
Tabela 6. Casos de rearranjos cromossômicos que apresentaram resultado normal no teste da QF-PCR em amostras de líquido amniótico extraídas de gestantes com risco aumentado para feto aneuploide, São Paulo, HCFMUSP	57
Tabela 7. Casos de rearranjos cromossômicos que apresentaram resultado normal no teste da QF-PCR em amostras de líquido amniótico extraídas de gestantes com risco aumentado para feto aneuploide, São Paulo, HCFMUSP.....	57
Tabela 8. Frequência de alelos encontrados na população brasileira em amostras de líquido amniótico extraídas de gestantes com risco aumentado para feto aneuploide, São Paulo, HC-FMUSP.....	58

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

% = porcentagem

µg: micrograma

µL: microlitro

mL: mililitro

A: nucleotídeo adenina

AFP: alfa feto proteína

C: nucleotídeo citosina

CAPPesq: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

DNA: ácido desoxirribonucleico

FISH: Hibridização in situ (*Fluorescent In Situ Hybridization*)

G: nucleotídeo guanina

IMT: Instituto de Medicina Tropical

Mb: Mega pares de bases nitrogenadas (1.000.000 pares de bases)

°C: Graus Celsius

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

L: litro

PAPP-A: proteína plasmática A associada à gestação

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase

QF-PCR: Reação em cadeia da polimerase fluorescente quantitativa (*Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction*)

RNA: ácido ribonucleico

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único (*Single NucleotidePolymorphism*)

STR: sequências simples repetidas (*Short Tandem Repeats*)

T: nucleotídeo timina

uE₃: estriol não-conjugado

USP: Universidade de São Paulo

β-hCG: subunidade β da gonadotrofina coriônica humana

Resumo

Resumo

Moraes RW. *Validação de teste de reação em cadeia da polimerase fluorescente quantitativa para detecção de aneuploidias fetais*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A reação em cadeia da polimerase fluorescente quantitativa (QF-PCR) é um método molecular de diagnóstico que se baseia na amplificação de pequenas sequências repetitivas do genoma (Short Tandem Repeats - STRs). Este método pode ser empregado para a detecção de aneuploidias durante a triagem pré-natal, porém, no Brasil, ainda não é utilizado nas instituições públicas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia da QF-PCR em comparação com a citogenética na detecção de aneuploidias. Foram avaliadas 162 amostras de líquido amniótico de gestantes com risco fetal de aneuploidia aumentado. As amostras foram coletadas no Ambulatório de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O DNA fetal, para a análise do QF-PCR, foi extraído do líquido amniótico e foram utilizados 24 marcadores moleculares fluorescentes para a amplificação de genes presentes nos cromossomos 13, 18, 21, X e Y. A interpretação foi baseada na análise quantitativa dos fragmentos obtidos na amplificação. A análise citogenética foi realizada segundo metodologia convencional. A QF-PCR foi realizada às cegas, sem o conhecimento do resultado citogenético. A concordância entre os resultados obtidos pela citogenética e pela QF-PCR foi de 93,2% (151/162), com sensibilidade total de 90% e especificidade de 97,2%. Quando analisado apenas os resultados passíveis de detecção pela QF-PCR, sem os rearranjos, a concordância atinge 98,1% com sensibilidade de 98,7% e especificidade de 97,2%. O presente estudo demonstra que a QF-PCR é um método eficiente e confiável para triagem pré-natal de aneuploidias. Para a investigação de alterações cromossômicas estruturais a avaliação citogenética é necessária.

Descritores: diagnóstico pré-natal; aneuploidia; instabilidade cromossômica; aberrações cromossômicas; fluorescência; reação em cadeia da polimerase.

Abstract

Abstract

Moraes RW. *Validation of quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) test to detect fetal aneuploidies* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Quantitative fluorescence polymerase chain reaction (QF-PCR) is a molecular diagnostic method based on the amplification of short tandem repeats (STRs) present in genome. This method is widely used to detect aneuploidies in prenatal screening, but, in Brazil, it is not used in public services. We investigated the accuracy of QF-PCR for the prenatal recognition of common aneuploidies and compared these results with cytogenetic results in our laboratory. A total of 162 amniotic fluid samples of pregnancies with high risk of fetus aneuploid were collected at the Obstetric Ambulatory of Hospital das Clínicas - Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. Fetal DNA was extracted and analyzed by multiplex QF-PCR kit, which contains 24 primer pairs located on chromosomes 13, 18, 21, X and Y. Cytogenetic analysis was performed based on conventional method. The results of cytogenetics test was not known while QF-PCR assay was performed. QF-PCR results were consistent with the results of cytogenetic analysis in 93.2% of all samples (151/162), with 90% total sensitivity and 97.2% specificity. When only possible results detected by QF-PCR are analyzed, without rearrangements samples, the agreement between both tests increases to 98.1%, with 98.7% sensitivity and 97.2% specificity. The present study demonstrates that QF-PCR was efficient and reliable for prenatal aneuploidy screening. This study suggests that QF-PCR can be used as a rapid diagnostic method; however, to structural chromosomal abnormalities cytogenetic analysis must be used.

Descriptors: prenatal diagnosis; aneuploidy; chromosomal instability; chromosome aberrations; fluorescence; polymerase chain reaction.

Introdução

1. Introdução

Aneuploidia é o ganho ou perda de um ou mais cromossomos implicando na alteração do número total de cromossomos da célula (1). As aneuploidias são as mais frequentes dentre as alterações cromossômicas sendo responsáveis pela maioria dos casos de deficiência mental, malformações congênitas, distúrbios de desenvolvimento sexual e abortos espontâneos (2). Estas alterações ocorrem, principalmente, devido a erros de divisão durante a meiose que resultam em gametas com o número de cromossomos anormal (3). Fetos aneuploides também podem ser resultantes de não-disjunção ocorrida durante a divisão mitótica do embrião em formação.

A síndrome de Down é causada pela presença de um cromossomo 21 a mais em todas as células (95% dos casos) ou em parte delas (1% dos casos) Também pode ocorrer devido a translocações que envolvem o cromossomo 21 e outro cromossomo acrocêntrico, na maioria dos casos. É a aneuploidia mais frequente com ocorrência em 1 a cada 700 nascidos vivos. Esta síndrome está associada a deficiência mental, malformações cardíacas, envelhecimento precoce, distúrbios hormonais e mal de Alzheimer (3, 4).

A síndrome de Edwards é a segunda aneuploidia mais comum ocorrendo em 1 a cada 6000 nascidos vivos. Essa síndrome está relacionada com a presença de um cromossomo 18 a mais nas células que resulta em baixo peso ao nascimento, rins em ferradura, onfalocele, hipoplasia genital, fenda facial, malformações cardíacas, entre outros. A probabilidade de sobrevivência é extremamente baixa: apenas 10% conclui o primeiro ano de vida (3, 5).

A síndrome de Patau também reduz significativamente a sobrevida do feto afetado: 44% dos nascidos vivos morrem logo após o primeiro mês de vida. Os afetados podem

apresentar microftalmia, fenda labial ou palatal, polidactilia e malformações generalizadas nos órgãos internos. Sua ocorrência é 1 a cada 10.000 nascidos vivos (1).

Dentre as alterações que envolvem os cromossomos sexuais, as mais frequentes são a síndrome de Turner e a síndrome de Klinefelter. A síndrome de Turner ocorre devido à ausência de um dos cromossomos do par sexual. As mulheres são mais afetadas por essa síndrome e é normal a ocorrência de aborto espontâneo. Somente 1% das gestações resulta em nascimento, mas as malformações associadas a síndrome dificultam a vida futura dos afetados (1, 2).

Na síndrome de Klinefelter, ocorre a presença de um cromossomo X extranumérico, levando a insuficiência na produção de testosterona, hipogonadismo, características sexuais secundárias pouco desenvolvidas e até retardo mental leve. Sua incidência é de 1:1000 nascidos vivos (1, 3, 4)

As trissomias do 21 (síndrome de Down), do 13 (síndrome de Patau), do 18 (síndrome de Edwards) e as alterações cromossômicas que envolvem os cromossomos sexuais, como, a síndrome de Turner (45, X) e Klinefelter (47, XXY) são as aneuploidias mais comumente encontradas entre os nascidos vivos, representando mais de 90% dos casos (4, 6, 7). Essas alterações são detectáveis por meio de métodos de diagnóstico no pré-natal.

Os métodos de diagnóstico pré-natal envolvem um conjunto de técnicas destinado a investigar a saúde fetal no período de vida intrauterina. Esses procedimentos fornecem informações a casais com risco de gerar uma criança com alteração cromossômica ou malformação congênita, permitem o planejamento do parto e o prognóstico gestacional (8). A idade materna avançada, acima de 35 anos, foi o primeiro fator associado ao o risco de desenvolvimento de uma criança com anomalias cromossômicas.

A triagem não-invasiva para avaliar o risco de aneuploidias, em geral, é composta por combinação entre a dosagem de marcadores proteicos no sangue materno, exames ultrassonográficos para a detecção de malformações fetais e medição da translucência nuchal além da idade materna avançada (>35 anos) (6).

Para identificação das gestantes que possuem risco aumentado de fetos possivelmente aneuploides são feitos testes de triagem. Os testes de triagem bioquímicos podem ser realizados no primeiro ou no segundo trimestre de gestação. No primeiro trimestre, são dosados marcadores como a fração livre da gonadotrofina coriônica humana livre (β -HCG) e proteína-A plasmática associada à gestação (PAPP-A). Já no segundo trimestre, ocorre a dosagem de alfa-fetoproteína (AFP), inibina A, estriol não-conjugado ($uE3$) e β -HCG. Cada marcador tem um nível de referência: o escore de risco de alteração é calculado para cada gestação a partir da integração dos testes descritos acima, levando em conta a idade materna e a idade gestacional (9). Os testes bioquímicos quando combinados com os exames ultrassonográficos e a medida da translucência nuchal, no primeiro e segundo trimestre, chegam a ter 90% de eficácia na detecção de anomalias fetais (5, 10).

Na década de 70 (6), foi introduzido mundialmente o diagnóstico pré-natal para a detecção de aneuploidias cromossômicas através da cultura e análise do cariótipo das células fetais extraídas de amostras de líquido amniótico, sangue de cordão umbilical e posteriormente vilosidades coriônicas (11). Esses procedimentos, por serem invasivos, estão associados a risco de danos ou perda fetal, aproximadamente, 1% (3, 5).

A análise cromossômica microscópica de células cultivadas tem sido considerada uma técnica padrão ouro para o diagnóstico de cromossomopatias (12). A citogenética tornou-se então uma ferramenta fundamental para o diagnóstico clínico pré e pós-natal. Essa 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. Esta análise permite a detecção precisa de anomalias numéricas e estruturais de todos os cromossomos. A grande desvantagem é o intervalo de tempo entre a coleta e a liberação dos resultados, que acaba sendo um tempo de muita ansiedade para os pais, principalmente se os exames de triagem não-invasivos (bioquímicos e ultrassonográficos), realizados durante o primeiro ou segundo trimestres, sugeriram um aumento do risco para essas alterações no feto.

Outra desvantagem é que existe a possibilidade do teste ser inconclusivo devido à falha de cultura de células fetais, que acontece em uma taxa que varia de laboratório para laboratório. No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (HC-FMUSP), a taxa de falha de cultura de células fetais é de 6,74%, segundo estimativa feita em estudo realizado no serviço (13), baseada nos resultados de 713 procedimentos invasivos.

A tecnologia da QF-PCR (Reação em cadeia da polimerase fluorescente quantitativa - *Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction*) foi primeiramente sugerido em 1993 (14). Desde então diversos estudos prospectivos foram realizados (2, 11, 15-32), culminando no desenvolvimento de uma análise conjunta para os cromossomos 13, 18, 21 e cromossomos sexuais (18, 33). Estes estudos indicaram que esta metodologia apresenta vantagens significativas em relação a outros testes moleculares, sendo mais robusto, menos trabalhoso e mais adequado para a aplicação em um grande número de amostras simultaneamente (34). Essa tecnologia tem uma limitação quanto a alterações cromossômicas estruturais, desbalanceadas e incomuns. Porém, essas são relativamente raras e quase sempre associadas a malformações fetais graves, podendo assim ser detectadas pelas técnicas convencionais da citogenética.

A proposta deste trabalho foi testar a QF-PCR para a detecção de aneuploidias, em gestantes com risco aumentado para aneuploidias no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Isso será vantajoso para diminuir as taxas de resultados inconclusivos por falha de cultura de células fetais, pois esta abordagem não depende da cultura dessas células, já que utiliza técnicas de biologia molecular que fazem a amplificação dos ácidos nucleicos fetais extraídos diretamente do material coletado.

Outra vantagem, da utilização desta abordagem nas amostras resultantes do procedimento invasivo, é o tempo para a liberação do resultado, que é bem menor em comparação ao cariótipo, pois não há a necessidade de espera para que as células fetais se proliferem em cultura. Dessa maneira, devido a inexistência de estudos que utilizaram a metodologia da QF-PCR no Brasil, a validação deste tipo de metodologia será uma inovação benéfica para o sistema de saúde pública, visto que, diversos estudos comprovaram a rapidez, especificidade, eficiência, praticidade e diminuição da ansiedade e estresse paternos, sendo, estes últimos, características imensuráveis. Além disso, o rápido diagnóstico de alterações cromossômicas permite o preparo da gestação, levando em consideração o emocional e psicológico dos pais e familiares, um aconselhamento genético adequado e o suporte multidisciplinar necessário (3).

Revisão de Literatura

2. Revisão de Literatura

2.1. Métodos laboratoriais de detecção de aneuploidias

2.1.1. Citogenética clássica

Na década de 50, Tjio e Levan (35) estabeleceram uma técnica para a predição do número correto de cromossomos humanos, feita através da cultura de células e visualização dos cromossomos em microscópio (cariótipo). Essa técnica, possibilitou a identificação de cada cromossomo e, a partir daí, a citogenética tem se desenvolvido cada vez mais, trazendo grande contribuição para o estudo de doenças humanas bem como para o estudo da população normal (36).

O método mais utilizado para se fazer a análise do cariótipo é a cultura de sangue total periférico. Nesse caso, colhe-se uma amostra de sangue do indivíduo a ser estudado e essas células são colocadas em cultura para que os leucócitos entrem em divisão celular. Após 72 horas, acrescenta-se uma solução contendo uma droga que interrompe a formação do fuso acromático, geralmente colchicina, e estaciona as células em divisão na metáfase, período de melhor visualização cromossômica (37). Após esse procedimento, os cromossomos são organizados de acordo com o tamanho e posição do centrômero, permitindo a contagem e análise morfológica dos mesmos. Com esse método, podem-se detectar alterações cromossômicas numéricas e estruturais (3).

Na década de 70, o cariótipo foi aprimorado pelo desenvolvimento de novas técnicas de coloração. Essas técnicas, chamadas bandeamento, estabeleceram a identificação precisa dos cromossomos humanos pelo padrão característico das bandas que eles apresentam. O primeiro método foi o bandeamento Q, que acrescentava quinacrina, uma substância

fluorescente (37). Após esse método, diversos outros métodos foram surgindo, sendo, o mais utilizado atualmente, o bandeamento G (6).

Esta técnica se mostrou mais simples do que as bandas Q por não necessitar do microscópio de fluorescência. Os cromossomos são desnaturados pela ação da tripsina e são corados com Giemsa. Ao serem observados ao microscópio, esses apresentam um padrão de bandas claras e escuras. As bandas G escuras possuem uma alta concentração de bases nitrogenadas do tipo Adenina (A) e Timina (T) e poucos genes ativos. Já as bandas claras possuem alta concentração de bases nitrogenadas do tipo Citosina (C) e Guanina (G) e muitos genes ativos. Cada banda representa centenas de genes.

Com o passar do tempo, novas técnicas de bandeamento foram sendo descobertas e utilizadas. Surgiu o bandeamento C que cora regiões de heterocromatina constitutiva e centromérica permitindo detecção de alterações nas regiões próximas ao centrômero. Bandeamento R é uma técnica que produz bandas complementares as bandas G e, por fim, o bandeamento NOR que identifica regiões organizadoras do nucléolo em cromossomos acrocêntricos. Nessas regiões estão localizados os genes para a produção de RNA ribossômico (37). O desenvolvimento dessas técnicas permitiu identificação de diversas alterações cromossômicas e, conseqüentemente, a aplicação clínica desses métodos no diagnóstico pré-natal (38).

A eficácia do cariótipo é aproximadamente 99% (2, 3, 39). Porém, apesar de o cariótipo ser um exame muito preciso e completo, existem algumas limitações, tais como: o baixo poder de automatização, o tempo para a obtenção de resultado, quantidade elevada de amostra para cultivo, o risco de falha na cultura por contaminação ou inexistência de crescimento celular, levando a ausência de diagnóstico e até mesmo na necessidade de

repetição do procedimento invasivo, especialmente quando este teste é um método de diagnóstico pré-natal (39).

Outra limitação acerca desse teste é a incapacidade de detecção de anomalias estruturais envolvendo menos de 10 Mb de DNA. (6, 39). Parte das alterações cromossômicas, as quais podem estar relacionadas a deficiências físicas e mentais, permanecerão não detectadas mesmo pela técnica padrão ouro (6). Neste contexto, surge a necessidade da existência de métodos mais rápidos de diagnóstico em que não seja necessária a cultura de células, a fim de reduzir a ansiedade do casal (2, 6, 17, 19, 21, 22, 31, 40-50). Várias técnicas têm sido desenvolvidas para o diagnóstico rápido de aneuploidias em amostras pré-natais. Após a descoberta de ácidos nucleicos fetais na circulação materna, diversos estudos têm focado no desenvolvimento de metodologias para o isolamento dessas moléculas, a fim de, aprimorar os métodos de diagnóstico não-invasivos na detecção das alterações cromossômicas fetais (51).

2.1.2. Genética molecular

Reação em cadeia da polimerase fluorescente quantitativa - QF-PCR

Mansfield (14), em 1993, observou que as sequências cromossômicas polimórficas e repetidas (*Short Tandem Repeats* – STRs), poderiam ser utilizadas como método de diagnóstico para a detecção de aneuploidias. Essas sequências, que contém de 3 a 6 bases, estão uniformemente intercaladas pelo genoma e variam entre os indivíduos. Para estudo no diagnóstico pré-natal, as STRs são amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) e os produtos marcados são separados por eletroforese capilar onde o tamanho e a intensidade de fluorescência dos alelos é analisada com o auxílio de um software específico. Podem-se

utilizar amostras de líquido amniótico, vilosidades coriônicas, sangue ou tecido fetal (3). Os resultados dos heterozigotos são utilizados para a interpretação.

O método é quantitativo, então, um padrão de alelos de dois picos iguais dentro da mesma região cromossômica é indicativo de diagnóstico de euploidia para o cromossomo em questão, enquanto que três picos dentro da mesma região cromossômica ou dois picos com uma proporção de 2: 1, são indicativos de trissomia para o cromossomo em questão. Na ausência de aneuploidias, cada marcador utilizado e informativo, terá dois picos com uma altura ou área na razão de 1:1, o que representa resultado normal de um indivíduo heterozigoto para o gene analisado (14, 20, 26, 27, 30, 39, 49, 52-64). Amostras com trissomia irão demonstrar 3 picos na razão de 1:1:1 no caso de um indivíduo heterozigoto contendo três alelos do gene analisado, ou dois picos na razão de 2:1, quando o indivíduo possuir dois alelos iguais e um diferente do gene amplificado (Figura 1) (11, 25, 28, 32). Caso a amostra demonstre apenas um único pico do gene, considera-se que ele é homozigoto e aquele marcador é determinado como não-informativo. Neste caso, deve-se refazer a amostra, anteriormente testada, aplicando a ela marcadores extras para a obtenção do resultado definitivo (6).

A dosagem dos níveis das STRs não muda conforme a idade materna ou idade gestacional sendo isso uma vantagem significativa em comparação com os marcadores bioquímicos, visto que estes, necessitam desses dados para a interpretação correta.

Figura 1. Ilustração dos quatro resultados possíveis para cada marcador do QF-PCR. Dissomia (presença de dois picos de mesmo tamanho), Trissomia (presença de três picos de mesmo tamanho ou dois picos com tamanho de proporção 2:1) e não informativo (presença de apenas um pico). (29)

Não há número mínimo ou máximo de amostras necessárias para a realização do teste. Contudo, para ser realizado, este necessita de investimento o que pode não ser indicado para centros que fazem a análise de poucas amostras devido ao custo-benefício. O uso da QF-PCR pode ser uma grande ajuda em países populosos, como a Índia, onde a detecção de doenças genéticas através da análise citogenética ainda é dificultada pela escassez de recursos e pela falta de profissionais qualificados para a técnica. Neste caso, a QF-PCR pode ser considerada como a única opção viável para o diagnóstico pré-natal em larga escala (23).

A QF-PCR pode colaborar na diferenciação da origem das trissomias, identificando se esses erros são provenientes de não disjunção meiótica ou mitótica. O padrão de três alelos detectados pelo teste indica erros de divisão originados na meiose, enquanto que o padrão dialélico dentro da mesma região cromossômica indica erros de divisão originados na mitose (28). A identificação da origem do erro de divisão celular pode colaborar com o aconselhamento genético, visto que erros de divisão originados na meiose indicam a presença de um feto trissômico o que nem sempre ocorre quando o erro é derivado da divisão mitótica, fato que, indica uma maior chance de se tratar de indivíduos mosaicos.

Vários estudos indicam que esse teste é rápido, eficiente, robusto e pode ser utilizado como única forma de detecção de aneuploidias como tem sido feito em centros de referência em saúde pelo mundo (28, 29). Além do mais, a porcentagem de falsos positivos e falsos negativos varia de 0% a 4,7% (26, 65). Devido às consequências, faz-se necessário o uso de testes de detecção de aneuploidias tenham especificidade e sensibilidade próximas a 100% (3).

2.2. Comparação QF-PCR e cariótipo

Ao longo de 23 anos desde o primeiro estudo realizado utilizando a técnica da QF-PCR, diversos estudos têm sido feitos para avaliar essa metodologia. Os estudos visam comparar a QF-PCR com o padrão ouro citogenético a fim de obter a metodologia com maior sensibilidade, baixo custo no menor tempo possível para a liberação dos resultados. Assim sendo, os pais podem ter um prognóstico adequado em relação a gestação e a futura prole.

Uma população de 2.167 gestantes, submetidas a amniocentese para diagnóstico pré-natal, foi testada para três marcadores moleculares contidos no cromossomo 21 a fim de detectar a síndrome de Down em seus descendentes. 99,6% dos marcadores utilizados foram informativos para o resultado do diagnóstico. 2.053 fetos apresentaram genótipo normal e 30 foram confirmados contendo a doença. Não houve resultado falso positivo ou falso negativo (50).

Em 1999, um estudo comparativo entre a QF-PCR e o cariótipo foi feito em 247 amostras de vilosidades coriônicas. Dessas amostras, 222 (90%) casos apresentaram genótipo normal e 25 (10%) genótipo alterado de acordo com a citogenética. Das amostras anormais, a QF-PCR, detectou 24, sendo um caso de trissomia do cromossomo 18 confirmado pelo cariótipo, resultante em amostra normal para a QF-PCR. Nenhum resultado falso

positivo foi obtido. Este estudo apresentou sensibilidade de 95,2% e especificidade de 100%, com taxa de 4,76% de falso positivos (48).

Schmidt et. al. (2000) (66), analisaram 662 amostras de líquido amniótico em gravidezes de risco e obtiveram excelente concordância entre a QF-PCR e o cariótipo. Nenhuma amostra falhou na amplificação e não houve falso positivo. Porém, uma amostra mosaico para a síndrome de Turner apresentou resultado normal na QF-PCR. Duas amostras foram não informativas: a primeira devido a contaminação materna, e, a segunda, devido ao padrão homozigótico dos três marcadores do cromossomo 18. A taxa de concordância nesse estudo variou de 94,6 a 98,3% de acordo com o marcador analisado.

Uma avaliação em larga escala foi realizada por Levett et. al. (2000) (67), contendo 5.097 amostras de líquido amniótico em comparação aos resultados obtidos pela citogenética. Os resultados foram obtidos em dois dias e houve 0,1% de falha de cultura devido à infecção fúngica e contaminação materna das amostras. 89 apresentaram alterações nos autossomos e todas foram identificadas pela QF-PCR. Em 2% dos casos, a QF-PCR permaneceu inconclusiva por apresentar marcadores homozigóticos não informativos para um dos cromossomos analisados (13, 18, 21, X e Y) mesmo após a introdução de marcadores extras. Este estudo, apresentou 68,2% de sensibilidade, 3,7% de resultados falso negativos e nenhum falso positivo. A taxa de detecção das trissomias do 13, 18, 21 e triploidia foi de 100%.

No início dos anos 2000 surgiu o primeiro relatório da aplicação clínica da QF-PCR no sistema de saúde pública do Reino Unido (25) como um teste de diagnóstico validado, e a partir daí, foi introduzido em outros centros de genética do Reino Unido, bem como em laboratórios privados (7, 22, 41, 68, 69) e no resto da Europa. O cariótipo só é realizado no Reino Unido caso ocorra detecção de malformações durante o exame ultrassonográfico,

translucência nugal aumentada e histórico familiar de rearranjo cromossômico. Caso não exista nenhuma dessas evidências durante os testes de triagem pré-natal, as amostras coletadas para diagnóstico serão avaliadas somente pela QF-PCR. Neste relatório de implantação do teste, 98% das amostras tiveram resultados informativos quando testadas pela QF-PCR e 2% das amostras permaneceram sem diagnóstico devido a ocorrência de contaminação materna.

Desde janeiro de 2005, em Estocolmo, na Suécia, as mulheres têm a opção de optar pela QF-PCR sozinha ou pela realização do cariótipo como teste diagnóstico pré-natal indicado para idade materna avançada, quando há risco aumentado para alguma doença monogênica específica ou ansiedade parental. Setenta por cento das mulheres escolhem a QF-PCR como único teste para a detecção de aneuploidias (69).

Cirigliano et. al. (2004) (19) obteve 93,2% de sensibilidade e 100% de especificidade na análise de 18.000 amostras fetais. Todas as trissomias envolvendo os cromossomos 13, 18, 21, triploidias e alterações numéricas dos cromossomos sexuais que não apresentavam mosaicismo foram detectadas. No ano seguinte, esse mesmo autor (20) utilizou 28.000 amostras fetais para a realização do teste obtendo 92,8% de sensibilidade e 100% de especificidade. No ano subsequente (21), foram analisadas 30.000 amostras que resultaram em 92,3% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Nos EUA, o primeiro estudo de validação da QF-PCR foi feito em 2006 (70). Os autores identificaram 100% das trissomias presentes nas amostras e nenhum falso positivo foi detectado. Dois casos de alterações envolvendo os cromossomos sexuais não foram diagnosticadas pela QF-PCR. Um total de 125 amostras (~18%) das amostras não amplificaram devido a quantidade insuficiente de produto. A contaminação materna esteve presente em 2,5% das amostras.

Na República Tcheca, um estudo feito após 5 anos de experiência clínica com a QF-PCR demonstrou 90% de sensibilidade e 100% de especificidade. Nesse país, a QF-PCR é feita em teste duplo conjuntamente à citogenética (7).

Após 9 anos de experiência clínica com a QF-PCR (22), 43.000 amostras foram analisadas pelos centros europeus de Barcelona e Turin. Amostras sem genótipo alterado resultaram em 95% do total (41.019 casos) pela QF-PCR. A citogenética detectou 99,6% de amostras normais. Do total, a QF-PCR identificou 1608 fetos contendo alterações cromossômicas comparado a 1.741 amostras com as mesmas alterações detectadas pela citogenética. Os resultados publicados indicaram que o grupo obteve 92,3% de sensibilidade e 100% de especificidade nesse estudo.

Na população coreana, um estudo foi feito comparando os resultados da citogenética com a QF-PCR em 800 amostras de líquido amniótico. Das 33 amostras aneuploides, 31 (93%) foram detectadas pela QF-PCR (71).

Badenas et. al. 2010 (69) compararam os resultados obtidos pela QF-PCR com a citogenética em 7.611 amostras. A concordância obtida foi de 98,5% entre os dois testes. Resultados discordantes com diferentes implicações no fenótipo fetal representaram 0,24% das amostras analisadas. Os autores evidenciam que, caso as indicações para a realização do cariótipo fossem iguais as utilizadas no Reino Unido, 10 das 18 amostras discordantes poderiam ter sido detectadas. Isso reforça a estratégia da necessidade de aplicação da citogenética em casos de triagem pré-natal alterada, (alterações na ultrassonografia, histórico familiar de alterações cromossômicas ou translucência nucal aumentada) e, resultado normal detectado pela QF-PCR.

Após 2 anos de experiência utilizando a QF-PCR como teste único para a detecção de aneuploidias, 9.737 amostras foram avaliadas no Reino Unido. Nas amostras com indicação

clínica para a realização do exame cariótipo durante a triagem pré-natal, a QF-PCR detectou 89% de todas as alterações presentes e 99,8% de todas as alterações em amostras que não tinham indicação clínica para a realização da citogenética (11).

No Egito, o estudo comparativo entre a QF-PCR e a citogenética não apresentou discrepâncias entre as metodologias testadas. As amostras apresentaram 100% de sensibilidade e 100% de especificidade (72). Estudos com diferentes populações: iraniana (63), turca (47), indiana (60, 61) e singapurense (64) apresentam os mesmos valores de detecção de aneuploidias pela QF-PCR.

Nos últimos 10 anos foram coletadas 40.624 amostras fetais para diagnóstico pré-natal no Reino Unido (29). Do total, 89% das amostras recebem resultado normal para aneuploidias dos cromossomos 13, 18 e 21. Somente 0,08% das amostras não foram informativas para um ou mais cromossomos testados e 98% das amostras tem seu resultado liberado após um dia da coleta da amostra.

Em um estudo feito na China (73), a QF-PCR apresentou 99,5% de concordância com a citogenética. Este estudo também apresentou baixos níveis de heterozigosidade para os marcadores do cromossomo 21. Os casamentos dificilmente ocorrem entre etnias diferentes no país pois trata-se de uma população mais conservadora cultural e historicamente. Desde 2010, a QF-PCR é oferecida às gestantes que passaram por procedimentos invasivos durante a triagem pré-natal.

Outro estudo com a população chinesa verificou a aceitação e escolha da QF-PCR como teste adicional e combinado com a citogenética. Nesse estudo, 49,3% das mulheres aceitaram a metodologia adicional. Os casos que rejeitaram o método justificaram por causa do alto custo (50,7%) e devido às limitações do teste quando comparadas à citogenética (12,7%) (74). Liao et. al. (2014) (75), posteriormente, comparou a QF-PCR com a citogenética

e obteve 93,3% de concordância entre as metodologias utilizadas. Por causa da política do filho único presente no país, as mulheres normalmente abortam o feto quando há descoberta de alterações cromossômicas. Também devido a essa política, não é uma opção incluir a QF-PCR como teste único de detecção de aneuploidias fetais. Todos os casos devem ser encaminhados para análise citogenética.

Papoulidis et. al. (2012) (76), concluiu que se a QF-PCR tivesse sido o único método diagnóstico, 78,1% de todas as alterações cromossômicas seriam detectadas. Caso a citogenética fosse aplicada somente em casos de teste prévio da QF-PCR normal além das indicações pela ultrassonografia e histórico familiar, ainda assim, 0,1% das doenças permaneceriam indetectáveis (36). A sensibilidade aumentaria para 95,4% se considerarmos o teste duplo combinado entre a QF-PCR e o cariótipo.

Na prática clínica de Sarajevo, a citogenética é o único método diagnóstico utilizado para a detecção de aneuploidias fetais. Relata-se um período de 45 a 90 dias para a liberação dos resultados através desse método no país. Após 17 meses de teste duplo entre a QF-PCR e a citogenética não houve discrepância na análise dos resultados.(77).

Altos índices de concordância entre os dois testes foram obtidos no estudo de Lildballe et. al. (2014) (78). Os pesquisadores encontraram sensibilidade que variou entre 96,4% a 100% e especificidade variou de 99,8% a 100%. Nos casos de mosaicismo, a sensibilidade foi de 44% neste estudo.

Em 2015, no sul da Espanha, 928 amostras foram analisadas e os resultados da QF-PCR obtiveram 88% de concordância com a citogenética (79). No mesmo ano, um estudo recente comparativo das metodologias foi realizado na população iraniana (80). Neste estudo, a QF-PCR apresentou 98,6% de resultados concordantes com a citogenética.

Dentre os diversos estudos analisados pode-se observar que a QF-PCR quando feita simultaneamente com o cariótipo apresenta uma concordância que varia de 75 a 100% (11, 15-22, 24-29, 32, 73, 75, 80). Essa discrepância pode ser explicada por amostras contaminadas com células maternas, falha na amplificação dos alelos ou mesmo falha de cultura durante a análise citogenética, alterações cromossômicas diferentes das que estão sendo testadas e níveis de mosaicismo baixos (quando a aneuploidia está presente em menos de 15-20% das células). Esses são os principais motivos relatados durante a comparação das metodologias.

Se quatro ou mais marcadores polimórficos de STRs forem utilizados para cada cromossomo analisado, poucas amostras ficarão não informativas devido a homozigose em alguns loci. Por mais baixa que seja a porcentagem de diagnósticos não informativos os mesmos não podem ser ignorados, pois isso acarretaria questões éticas graves pela adoção dessa política, portanto, outras formas de diagnóstico devem ser aplicadas (76).

Objetivo

3. Objetivo

1. Detectar aneuploidias em amostras de líquido amniótico provenientes de gestantes com risco aumentado de feto afetado utilizando a técnica da QF-PCR.
2. Determinar a eficácia do teste QF-PCR, em comparação aos resultados de cariótipo previamente obtidos pelo Laboratório Central do HC-FMUSP.

Casuística e Métodos

4. Casuística e Métodos

4.1 Casuística

Este foi um estudo retrospectivo, secundário a outro estudo prospectivo, dissertação de mestrado da aluna Renata Moscolini Romão que tem como título “Investigação dos polimorfismos do gene PLAC4 na população brasileira”.

Foram utilizadas 162 amostras de líquido amniótico, previamente congeladas, que foram coletadas durante o período de agosto de 2009 a maio de 2013 de pacientes que receberam atendimento na Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), para o projeto de pesquisa “Investigação dos polimorfismos do gene PLAC4 na população brasileira” e atenderam aos critérios de inclusão e exclusão descritos abaixo:

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

Critérios de Exclusão:

- Não obtenção do resultado do cariótipo fetal por falha de cultura do líquido amniótico
- Gestantes que optarem 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 A), contendo todas as informações sobre a pesquisa, previamente aprovada pelo do Comitê de Ética e Pesquisa da FMUSP (Protocolo n°: 07889/08 - anexo B).

Após a aplicação do termo de consentimento, solicitou-se que cada voluntário fizesse uma autoclassificação em relação à sua raça ou cor de pele. A classificação da população brasileira por cor ou raça utilizada neste estudo seguiu os padrões do último Censo Demográfico, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2010, onde foi utilizado o seguinte conjunto de categorias: branca, preta, parda, oriental e indígena.

Foram coletadas amostras de 20 mL de líquido amniótico, dos quais 1 mL foi cedido à pesquisa. A decisão da paciente em realizar o procedimento não é 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). O líquido amniótico foi separado em alíquotas de 500 µL em tubos de polipropileno. Todas as amostras foram armazenadas em freezer -70 °C para posterior análise.

Os critérios para a indicação clínica da amniocentese na Clínica Obstétrica do HC-FMUSP foram: idade materna aumentada (≥ 35 anos), translucência nuchal aumentada, presença de malformação fetal ao ultrassom e gestações anteriores com alterações genéticas. 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-SP) sob a orientação do Dr. José Eduardo Levi.

4.2.1 Coleta e processamento das amostras de líquido amniótico

Foram coletados cerca de 1 mL de líquido amniótico via amniocentese. Logo após a coleta os tubos foram levados ao laboratório onde ficaram refrigerados até o momento da extração.

4.2.2 Extração de DNA genômico

Uma alíquota de 500 µL de 200 amostras de líquido amniótico foi descongelada e o DNA foi extraído utilizando-se o kit QIAamp DNA Blood Mini (QIAGEN), seguindo-se o protocolo descrito no kit. Na extração foi utilizado 250 µL de líquido amniótico. Inicialmente foi feita a lise das células com Proteinase K para a liberação do DNA, o qual se liga à membrana de sílica presente nas colunas de centrifugação com a utilização de tampões específicos. O DNA ligado à membrana foi purificado em etapas posteriores de lavagem com tampões específicos para remoção de resíduos contaminantes, e então, foi eluído em tampão apropriado para o armazenamento. A eluição foi feita em 65 µL de tampão.

4.2.3 Determinação da concentração e pureza do DNA extraído

A concentração de DNA de cada uma das amostras foi determinada através de medida espectrofotométrica no aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Água deionizada foi utilizada para calibrar o espectrofotômetro. O aparelho fornece a concentração do DNA em ng/ μ L e medidas das absorbâncias nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. A pureza do DNA foi determinada calculando-se a razão entre a absorbância a 260 nm e a absorbância a 280 nm (A_{260}/A_{280}). Amostras puras de DNA continham uma razão A_{260}/A_{280} entre 1,7 e 1,9. Após determinada a concentração de DNA de cada amostra, elas foram utilizadas com concentração entre 1,5 a 15,0 ng/ μ L e armazenadas a -20°C até o preparo da reação. As amostras que continham a concentração maior do que a prevista pelo kit foram diluída a fim de seguir as recomendações exigidas.

4.2.4. Amplificação QF-PCR

O DNA foi amplificado pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se a enzima HotStarTaq Polymerase (QIAGEN), as misturas de reação (que contém uma solução com primers e sondas para os cromossomos 21, 13, 18, X e Y, Magnésio e Tampão em concentrações apropriadas para a amplificação) fornecidos no kit ChromoQuant QF-PCR v.3 (Cybergene AB) e DNA na concentração de 1,5 a 15 ng/ μ L. A reação foi ciclada em termociclador Eppendorf Mastercycle Gradient (Eppendorf). As reações tiveram volume final

de 25 µL, onde foram colocados 14,5 µL da mistura de PCR, 0,5 µL de HotStart Taq Polymerase (QIAGEN) e 10 µL da amostra de DNA extraído, como descrito no kit.

Os ciclos de variação de temperatura utilizados foram os descritos no kit: primeiro ciclo 95 °C por 15 minutos, seguido de 26 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 1 minuto e 71 °C por 2 minutos, com extensão final 71 °C por 5 minutos e 60 °C por 1 hora. O produto amplificado ficou armazenado em freezer -20 °C, até o momento da aplicação no sequenciador.

4.2.5. Análise dos fragmentos em Sequenciador Capilar

O produto amplificado foi corrido em sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems), para análise dos fragmentos gerados na amplificação, seguindo especificações de corrida descritas no protocolo do kit e transcritas abaixo (tabela 1):

Tabela 1 - Descrição das especificações da eletroforese por capilaridade em sequenciador ABI 3130 de acordo com o protocolo do kit ChromoQuant QF-PCR (311.003-52)

ABI 3130	
Voltagem da	1,2 kV
Tempo de injeção	15-23 segundos
Voltagem da	15 kV
Matriz	DS-30 (ABI), 6-FAM, HEX, NED
Conjunto de filtros	Filtro D
Tempo de corrida	60 minutos
Polímero	POP7 (3130, 3730) POP4 (3100)
Mix de preparo	12 µL HiDi FA + 0,3 µL tamanho padrão + 0,5-1,0 µL
Tamanho padrão	GeneScan-500 ROX

4.2.6. Análise Molecular

O resultado da corrida no sequenciador foi analisado pelo programa GeneMarker (Softgenetics) que permite a visualização do padrão de alelos para cada marcador, representado por picos em um gráfico. Os marcadores utilizados no kit estão descritos nas tabelas 2 e 3 a seguir:

Tabela 2 – Relação dos marcadores fluorescentes para os cromossomos X, Y e 21 presentes no kit CromoQuant QF-PCR v.3 (Cybergene AB) (311.003-52) – Mix Azul

Identificação	Localização	Cromossomo	Tamanho	Cor
DXS6854	Xq26.1	X	91-119	Azul
DXS6803	Xq21.31	X	101-139	Verde
D21S1409	21q21.2	21	189-219	Amarelo
SRY	Yp11.31	Y	202-207	Azul
X22	Xq28Yq	X/Y	190-250	Verde
D21S11	21q21.1	21	224-270	Amarelo
D21S1246	21q22.2	21	282-336	Verde
D21S1411	21q22.3	21	283-344	Amarelo
D21S1444	21q22.13	21	300-345	Azul
D21S1435	21q21.1	21	350-410	Verde

Tabela 3 – Relação dos marcadores fluorescentes para os cromossomos X, Y, 13 e 18 presentes no kit CromoQuant QF-PCR v.3 (Cybergene AB) (311.003-52) – Mix Branco

Identificação	Localização	Cromossomo	Tamanho	Cor
AMEL	Xp22.31 – Xp22.1	X/Y	X: 103-108	Verde
D13S797	13q33.2	13	175-250	Azul
D18S391	18p11.31	18	135-185	Verde
D18S976	18p11.31	18	166-201	Amarelo
D18S819	18q11.2	18	230-275	Amarelo
XHPRT	Xq26.1	X	260-304	Azul
D13S742	13q12.13	13	230-326	Verde
DXYS218	Xp22.32 / Yp11.3	X/Y	310-350	Azul
D18S390	18q22.3-18q23	18	315-360	Amarelo
D18S386	18q22.1	18	330-405	Verde
D13S634	13q21.33	13	380-445	Azul
D13S628	13q31.1	13	420-475	Amarelo
D13S305	13q13.3	13	425-470	Verde
D18S535	18q12.3	18	450-505	Azul

A análise dos resultados foi feita sem o conhecimento do cariótipo. Um padrão de alelos de dois picos iguais dentro da mesma região cromossômica é indicativo de diagnóstico normal heterozigoto para o cromossomo em questão, enquanto três picos dentro da mesma região cromossômica com proporção de 1:1:1 ou dois picos com uma proporção de 2: 1, são indicativos de trissomia para o cromossomo em questão. Para confirmar o número de cromossomos fetais são necessários, no mínimo, dois marcadores informativos para cada cromossomo. Um único pico em todos os marcadores de determinado cromossomo é indicativo de monossomia.

A QF-PCR é um método quantitativo, portanto, as áreas e as alturas dos picos são de tamanhos comparáveis. A altura e/ou a área do menor alelo é dividida pela altura e/ou a área do maior alelo e o número gerado é analisado. Alelos normais têm uma razão entre 0,8 a 1,4 e alelos indicativos de trissomia tem uma razão que pode ser menor que 0,65 ou maior que 1,8. Esse número é gerado automaticamente pelo programa GeneMarker (Softgenetics).

Resultados

5. Resultados

5.1. Caracterização da população

Foram incluídas no estudo 102 gestantes autodeclaradas brancas, 45 pardas, 9 pretas, 3 orientais, 2 indígenas e 1 não informou a sua classificação quanto a raça. Estes dados estão descritos no gráfico da figura 2.

Figura 2 – Representação gráfica da distribuição a partir da autodeclaração da cor das gestantes voluntárias do estudo “Validação do teste reação em cadeia da polimerase fluorescente quantitativa (QF-PCR) para a detecção de aneuploidias fetais” realizado na cidade de São Paulo, no período de outubro de 2013 a outubro de 2016.

As gestantes voluntárias da pesquisa possuíam entre 14 e 49 anos (média = 30 anos; mediana = 29 anos), sendo que 55 (33,95%) mulheres possuíam 35 anos ou mais. A média e a mediana da idade gestacional no momento da amniocentese foi de 23 semanas, variando entre 11 e 34 semanas de gestação.

5.2. Resultado amostral

Foram analisadas 162 amostras de líquido amniótico provenientes de gestantes com risco aumentado para aneuploidias. A quantidade de amostras e o resultado do cariótipo fetal estão relacionados na tabela 4 abaixo:

Tabela 4 – Resultado citogenético das amostras de líquido amniótico fetal extraídas de gestantes com risco aumentado para feto aneuploide, São Paulo, HC-FMUSP.

Cariótipo	Quantidade de amostras
Trissomia do 21	28
Trissomia do 18	21
Trissomia do 13	9
45, X	17
Triploidia	2
Rearranjos	8
Mosaicos	5
46, XX	42
46, XY	30
TOTAL	162 amostras

Das 162 amostras analisadas 90 amostras (56%) apresentaram o cariótipo alterado e 72 amostras (44%) apresentaram o cariótipo normal. Do total, 151 amostras (93,2%) foram concordantes entre o exame do cariótipo e a QF-PCR com 90% de sensibilidade e 97,2% de especificidade. Esses resultados estão apresentados na tabela 5. Do total de amostras, foram identificadas duas amostras falso positivas e uma amostra falso negativa. Todos os resultados puderam ser obtidos após 48 horas do início da análise.

A amostra falso negativa para o teste da QF-PCR trata-se de um caso de mosaicismo para síndrome de Turner (45, X/46, XX). Esta amostra foi revelada como feto feminino normal para o teste QF-PCR. Esse teste não detecta baixos níveis de mosaicismo (menor do que 15% das células afetadas) (25, 28, 76).

Amostras falso positivas foram detectadas em dois casos com o teste da QF-PCR: um feto masculino normal na citogenética, que apresentou alteração em dois marcadores do cromossomo 18 sendo diagnosticado como trissômico para o cromossomo em questão. Isto pode ter ocorrido devido à contaminação materna da amostra, pois foi verificado posteriormente que a amostra analisada possuía resquícios de sangue materno. O segundo caso falso positivo foi uma amostra normal do sexo feminino que durante a análise citogenética apresentou metáfases poliploides. Esse feto feminino normal foi diagnosticado como poliploide para o teste da QF-PCR, tendo alterações nos marcadores dos cromossomos X, 13, 18 e 21 sendo que 9 marcadores apresentaram essas alterações – DSX6854, X22, XHPRT, DXYS218, D18S391, D18S819, D18S976, D21S1411 e D21S1444.

Tabela 5 – Comparação dos resultados obtidos pela citogenética e pelo teste QF-PCR em amostras de líquido amniótico extraídas de gestantes com risco aumentado para feto aneuploide, São Paulo, HC-FMUSP.

Cariótipo	Citogenética, N (%)	QF-PCR, N (%)
46, XX; 46, XY	72 (44)	70 (43)
	*46, XX (metáfases	*69, XXX
	**46, XY	**46, XY, +18
47, XX, +21; 47, XY, +21	28 (17)	28 (17)
47, XX, +18; 47, XY, +18	21 (13)	21 (13)
47, XX, +13; 47, XY, +13	9 (6)	9 (6)
Síndrome de Turner (45, X)	17 (10)	17 (10)
Triploidia (69, XXX; 69, XXY)	2 (1)	2 (1)
Mosaicos	5 (3)	4 (2)***
Rearranjos	8 (5)	0 (0)
Total de anomalias cromossômicas	90 (56)	81 (50)
Eficácia (%)	100	93

*Mulher normal com metáfases poliploides pelo cariótipo e detectada como triploide pelo teste da QF-PCR. **Homem normal pelo cariótipo detectado como trissômico para o cromossomo 18 pelo teste da QF-PCR. ***Mulher mosaico para a síndrome de Turner pelo cariótipo detectada como mulher normal pelo teste da QF-PCR.

A seguir estão os eletroferogramas mostrando os picos alélicos que obtivemos nestas amostras concordantes (figuras 3 a 11) para cinco amostras com cariótipos confirmados de

46, XY (figuras 3 e 4), 47, XY, +13 (figura 5), 45, X (figuras 6 e 7), 47, XX, +21 (figura 8), 47, XY, +18 (figuras 9) e 69, XXY (figuras 10 e 11) realizados pelo laboratório central do HC-FMUSP.

Figura 3. Amostra 1 – 46, XY. Eletroferograma mostrando os marcadores para os cromossomos X, Y e 21. Padrão heterozigótico (em vermelho) 1:1 para os marcadores D21S144, X22, D21S1435, D21S1409, D21S11. Padrão homozigótico, não-informativo, para os marcadores DXS6854, DXS6803, D21S1246, D21S1411. Sexo masculino confirmado pela presença do SRY.

Figura 4. Amostra 1 – 46, XY. Eletroferograma mostrando os marcadores para os cromossomos 13, 18, X e Y. Padrão heterozigótico (em vermelho) 1:1 para os marcadores D13S797, DXYS218, D13S634, D18S535, AMEL, D13S742, D18S386, D13S305, D18S976 e D13S628. Padrão homozigótico, não-informativo para os marcadores XHPRT, D18S391, D18S819 e D18S390.

Figura 5. Amostra 17 – 47, XY, +13. Eletroferograma mostrando os marcadores para os cromossomos 13, 18, X e Y. Padrão trissômico (em vermelho) 2:1 para os marcadores D13S797, D13S305 e D13S628. Padrão trissômico (em vermelho) 1:1:1 para os marcadores D13S634 e D13S742. Padrão heterozigótico 1:1 para os marcadores DXYS218, D18S391, AMEL, D18S976 D18S819 e D18S390. Padrão homozigótico, não-informativo, para os marcadores XHPRT, D18S535 e D18S386.

Figura 6. Amostra 37 – 45, X. Eletroferograma mostrando os marcadores para os cromossomos X, Y e 21. Padrão heterozigótico 1:1 para os marcadores D21S1246, D21S1435, e D21S11. Padrão homozigótico (em vermelho), não-informativo para os marcadores DXS6854, , DXS6803, X22. Padrão homozigótico, não-informativo para os marcadores D21S1444, , D21S1409 e D21S141. Sexo feminino confirmado pela ausência do SRY.

Figura 7. Amostra 37 – 45, X. Eletroferograma mostrando os marcadores para os cromossomos 13, 18, X e Y. Padrão heterozigótico 1:1 para os marcadores D13S634, D13S535, D18S391, D13S742, D18S386, D18S305, D18S976, D18S819 e D13S628. Padrão homozigótico (em vermelho), não-informativo, para os marcadores XHPRT, DXYS218, AMEL. Padrão homozigótico, não-informativo, para os marcadores D13S797, D18S390. Sexo feminino confirmado pela ausência do SRY.

Figura 8. Amostra 38 – 47, XX+21. Eletroferograma mostrando os marcadores para os cromossomos X, Y e 21. Padrão trissômico (em vermelho) 2:1 para os marcadores D21S1246, D21S1435, D21S1409 e D21S1411. Padrão trissômico (em vermelho) 1:1:1 para os marcadores D21S1444, D21S11. Padrão heterozigótico 1:1 para o marcador DXS6803. Padrão homozigótico, não-informativo para os marcadores DXS6854 e X22. Sexo feminino confirmado pela ausência do SRY.

Figura 9. Amostra 70 – 47, XY, +18. Eletroferograma mostrando os marcadores para os cromossomos 13, 18, X e Y. Padrão trissômico (em vermelho) 2:1 para os marcadores D18S535, D18S391. Padrão trissômico (em vermelho) 1:1:1 para os marcadores D18S390. Padrão heterozigótico 1:1 para os marcadores D13S797, DXYS218, AMEL, D13S742, D18S386 e D13S628. Padrão homozigótico, não-informativo, para os marcadores XHPRT, D13S634, D13S305, D18S976 e D18S819.

Figura 10. Amostra 5 – 69, XXY. Eletroferograma mostrando os marcadores para os cromossomos X, Y e 21. Padrão heterozigótico 1:1 para os marcadores DXS6854 e DXS6803. Padrão trissômico (em vermelho) 2:1 para os marcadores X22, D21S1246, D21S1435, D21S1409 e D21S11. Padrão trissômico (em vermelho) 1:1:1 para os marcadores D21S1444 e D21S1411. Sexo masculino confirmado pela presença do SRY

Figura 11. Amostra 5 – 69, XXY. Eletroferograma mostrando os marcadores para os cromossomos 13, 18, X e Y. Padrão trissômico (em vermelho) 2:1 para os marcadores D13S797, DXYS218, D13S634, AMEL, D18S391, D13S742, D18S386, D13S305 e D13S628. Padrão trissômico (em vermelho) 1:1:1 para o marcador D18S535. Padrão heterozigótico 1:1 para o marcador XHPRT e D18S976. Padrão homozigótico, não-informativo, para os marcadores D18S390 e D18S819.

As amostras que apresentaram rearranjos cromossômicos (translocações, duplicações, inversões, deleções entre outros) quando analisadas pela QF-PCR apresentaram resultado normal. Do total, 8 amostras possuíam rearranjos (tabela 6). Se esses rearranjos forem excluídos do total, a porcentagem de concordância entre a QF-PCR e o cariótipo aumenta para 98,1% (151/154) com 98,7% de sensibilidade e 97,2% de especificidade.

Tabela 6 – Casos de rearranjos cromossômicos no cariótipo por cultura e que apresentaram resultado normal no teste da QF-PCR em amostras de líquido amniótico extraídas de gestantes com risco aumentado para feto aneuploide, São Paulo, HCFMUSP.

Rearranjos	QF-PCR
46, XX, +add (7) (q33)	46, XX
46, XX, +13 rob (13, 14) (q10q10)	46, XX
46, Y, t (X.14) (q22q31)	46, XY
46, XX, +i (1) (q10)	46, XX
46, XY, inv (9)	46, XY
46, XY, inv (9) (p12q13)	46, XY
46, XX, del (11) (q22)	46, XX
46, XY, dup (3)(p21.2p25)	46, XY

Dos cinco casos de mosaicismo confirmados pela citogenética, quatro foram detectados como alterados trissômicos para os cromossomos responsáveis pelo mosaicismo. Os resultados dos indivíduos mosaicos estão descritos na tabela 7. Se os casos de rearranjos e de mosaicismo fossem excluídos da amostragem seria possível obter 100% de sensibilidade e 98,6% de especificidade.

Tabela 7 – Casos de rearranjos cromossômicos que apresentaram resultado normal no teste da QF-PCR em amostras de líquido amniótico extraídas de gestantes com risco aumentado para feto aneuploide, São Paulo, HCFMUSP.

Mosaicos	QF-PCR
45, X / 46, XX, +mar	46, XX
46, XY / 47, XY, +18	47, XY, +18
46, XY / 47, XY, +18	47, XY, +18
47, XX, +13 / 48, XX, +13 mar	47, XX, +13
47, XX, +mar / 47, XX, +13	47, XX, +13

A seguir na tabela 8 estão relatados os marcadores fluorescentes amplificados e a sua localização para cada cromossomo em questão, a quantidade e a porcentagem desses alelos nas amostras analisadas.

Tabela 8 –Quantidade e frequência de alelos encontrados na população brasileira em amostras de líquido amniótico extraídas de gestantes com risco aumentado para feto aneuploide, São Paulo, HC-FMUSP.

Marcador	Localização no	Monoalélico, N	Dialélico, N	Trialélico, N
AMEL	Xp22.31 – Xp22.1	93 (58)	66 (41)	2 (1)
DXYS218	Xp22.32 / Yp11.3	67 (41)	91 (56)	4 (2)
DXS6803	Xq21.31	100 (62)	58 (36)	3 (2)
DXS6854	Xq26.1	107 (66)	52 (32)	3 (2)
XHPRT	Xq26.1	97 (60)	63 (39)	2 (1)
X22	Xq28Yq	38 (66)	10 (17)	10 (17)
D21S11	21q21.1	26 (16)	114 (70)	22 (13)
D21S1246	21q22.2	40 (25)	97 (60)	25 (15)
D21S1409	21q21.2	48 (30)	86 (53)	27 (17)
D21S1411	21q22.3	25 (42)	111 (19)	23 (39)
D21S1435	21q21.1	36 (23)	96 (60)	28 (18)
D21S1444	21q22.13	33 (20)	103 (63)	25 (15)
D18S386	18q22.1	22 (14)	112 (69)	26 (16)
D18S390	18q22.3-18q23	72 (44)	80 (49)	10 (6)
D18S391	18p11.31	39 (24)	105 (65)	18 (11)
D18S535	18q12.3	31 (19)	108 (67)	18 (11)
D18S819	18q11.2	39 (24)	107 (66)	16 (10)
D18S976	18p11.31	41 (25)	100 (62)	21 (13)
D13S305	13q13.3	57 (38)	80 (54)	12 (8)
D13S628	13q31.1	45 (28)	104 (64)	8 (5)
D13S634	13q21.33	50 (31)	96 (61)	12 (8)
D13S742	13q12.13	14 (9)	133 (83)	13 (9)
D13S797	13q33.2	36 (22)	111 (69)	13 (8)

Podemos observar que para o cromossomo 13 o marcador mais frequentemente encontrado na população foi o D13S742, para o cromossomo 18 foi D18S386 e para o cromossomo 21 o D21S11. É importante ressaltar que esses marcadores indicam quais são os melhores para serem utilizadas na população brasileira visto que essa frequência indica a proporção de heterozigose.

Discussão

6. Discussão

Na maioria dos países, incluindo o Brasil, a citogenética convencional tem sido utilizada em larga escala para a detecção de alterações cromossômicas como método de diagnóstico pré-natal. A vantagem desse método é a precisão dos resultados principalmente (3, 80), com relação à detecção de alterações cromossômicas estruturais como translocações, balanceadas ou não, inversões, deleções e duplicações. Isso é possível devido à alta resolução de técnicas de bandeamento, facilitando a interpretação dos cromossomos. Contudo, sabemos que o exame do cariótipo tem algumas limitações sendo a principal delas a necessidade do cultivo de células que precisam se multiplicar *in vitro*. Este exame, leva geralmente de 2 a 4 semanas para ser liberado por causa do tempo de cultura e da análise e interpretação dos resultados.

Além do tempo decorrido até o diagnóstico final, outra desvantagem do cariótipo, é que este necessita de mão-de-obra especializada para a interpretação correta dos resultados. A possibilidade de ocorrência de falha de crescimento das células fetais durante o período de cultura é o que mais preocupa as gestantes submetidas aos procedimentos invasivos para a diagnóstico de alterações cromossômicas fetais, pois, caso isso ocorra, provavelmente elas não se submeterão a uma nova coleta de amostra fetal, visto que, é um procedimento invasivo e doloroso. Não obstante, os pais ficarão sem saber se o filho possui a alteração cromossômica.

Gestantes submetidas a exames pré-natais anseiam pelo rápido resultado negativo de alterações cromossômicas de sua prole e qualquer procedimento que possa encurtar esse tempo de espera deve ser utilizado para que os pais não fiquem estressados em um momento tão delicado como a gestação. A ansiedade parental pode levar a complicações e até perda

fetal durante a gestação. Portanto, a busca por outros métodos diagnósticos de detecção de aneuploidias aumentou a demanda de testes não convencionais tais como FISH, QF-PCR, arranjos de DNA e até de métodos mais recentes como análise de DNA fetal através do sangue materno e análise completa do genoma fetal.

Desde sua apresentação em 1993, a QF-PCR têm sido testada amplamente em diversos países com diferentes tipos de populações. Este teste tem se mostrado eficaz tanto para populações geneticamente heterogêneas (2, 11, 15-32, 66, 69) (altas taxas de casamentos aleatórios entre diferentes etnicidades), como para populações no qual o nível de heterozigosidade é mais baixo (47, 63, 71-73, 75) (alto número de casamentos consanguíneos ou casamentos de mesma etnicidade). Nenhum desses estudos retratava a eficácia desse teste para uma população amplamente heterogênea como a brasileira. Além disso, a QF-PCR já é padronizada e utilizada como único teste de detecção de aneuploidias em diversos países (2, 11, 15-32), nos serviços públicos e privados, e, no Brasil, somente os serviços privados oferecem esse tipo de teste. Os serviços públicos brasileiros utilizam unicamente a citogenética no diagnóstico de alterações cromossômicas numéricas. Diante disso, este estudo baseou-se na investigação da eficácia da QF-PCR em comparação com os resultados da citogenética convencional.

A QF-PCR apresentou uma concordância de 93% com o exame do cariótipo com sensibilidade de 90% e especificidade de 97,2%. Esses resultados estão em concordância com diversos estudos (7, 11, 19, 22, 66, 71, 75). Caso os rearranjos sejam excluídos da análise, a concordância se eleva para 98,1% com sensibilidade de 98,7% e especificidade de 97,2%. Todos os resultados puderam ser obtidos após 48 horas do início da análise o que está em concordância com a maioria dos estudos feitos até o momento (2, 22, 28, 60, 71). Devido a

rapidez na liberação dos resultados, a QF-PCR pode reduzir até 95% da ansiedade parental (2).

Era de nosso conhecimento que esse teste não possui a capacidade de detectar alterações cromossômicas estruturais. No nosso estudo, essas amostras alteradas estruturalmente representaram 4,93% do total e na população em geral essas alterações representam 1% (65). O número de alterações cromossômicas estruturais foi elevado no nosso estudo pois a maioria das amostras coletadas possuíam um alto índice de alterações nos exames de triagem obtidos antes dos procedimentos invasivos. As principais indicações clínicas para a coleta de células fetais são as malformações detectadas durante a ultrassonografia, translucência nuchal aumentada, histórico familiar de alterações cromossômicas ou gênicas e abortos recorrentes. A normalidade obtida pelo teste da QF-PCR ainda pode representar 0,1% de risco residual para alterações cromossômicas clinicamente significativas (75). Mesmo sendo de baixa frequência na população, essas alterações incomuns não devem ser excluídas do diagnóstico pré-natal devido à importância clínica para a sobrevivência dos fetos afetados.

Dentre as amostras analisadas, foram detectadas duas amostras falso positivas (1,23%) e uma amostra falso negativa (0,61%). A amostra falso negativa foi obtida em um caso de mosaicismo para síndrome de Turner (cariótipo confirmado: 45, X / 46, XX). Sabe-se que a QF-PCR tem algumas falhas de detecção quanto a alterações cromossômicas numéricas que envolvam o par de cromossomos sexuais, X e Y. O principal problema referente a detecção dos cromossomos sexuais é a dificuldade de interpretação quando a QF-PCR apresenta padrão homozigoto que é indistinguível das amostras femininas que apresentam um único cromossomo X. A incorporação de mais marcadores do cromossomo X pode reduzir a probabilidade de homozigose e resultados inconclusivos (6, 21, 23, 29, 32, 70).

Além disso, não é possível a detecção de indivíduos mosaicos pela QF-PCR, principalmente se as células alteradas forem menor do que 15% do total de células analisadas (2, 23).

As amostras falso positivas foram resultantes de uma amostra com cariótipo confirmado de feto feminino (46, XX), porém, com a descrição de metáfases poliploides e um feto normal masculino confirmado ao cariótipo (46, XY), respectivamente. A primeira, apresentou alterações nos cromossomos X, 13, 18 e 21 e foi diagnosticada como poliploide na QF-PCR. Não sabemos a implicação clínica desse caso pois o feto não foi analisado pós-parto e não há relatos de caso como esse na literatura.

A segunda amostra falso positiva foi detectada como trissômica para o cromossomo 18. Isso pode ter ocorrido devido a contaminação de células maternas ou duplicações microscópicas que não tem impacto no fenótipo fetal. Essa amostra apresentou um padrão extra de alelos entre dois fragmentos do cromossomo 18 indicando ser uma possível contaminação materna.

As contaminações de células maternas geralmente variam de acordo com o estudo devido ao tipo de procedimento realizado no momento de coleta das amostras. Esses resultados são mais comuns em amostras que apresentam resquícios de sangue materno. Para evitar esse tipo de contaminação, geralmente, recomenda-se que as amostras com manchas de sangue sejam lavadas com solução tampão várias vezes para que restem somente células fetais na análise. A contaminação materna também pode ser identificada caso amostras de sangue da mãe sejam recolhidas no mesmo momento em que as amostras a serem analisadas pela QF-PCR foram coletadas ou posteriormente a um resultado suspeito de contaminação (6). A partir daí, é possível fazer uma comparação de alelos sanguíneos e alelos fetais diminuindo a taxa inconclusiva de amostras em que há contaminação materna.

As STRs não se alteram com a idade gestacional o que representa uma vantagem em relação aos marcadores não invasivos bioquímicos, já que estes necessitam ser testados em diferentes estágios da gestação para ter sua eficácia comprovada. Por terem tamanhos variados, essas sequências amplificadas são identificadas em vários loci polimórficos do genoma o que faz com que haja maior precisão na detecção de trissomias com baixas taxas de falso positivos.

Os marcadores mais informativos na nossa amostra populacional foram: D13S742, D18S386 e D21S11 que estão localizados nos cromossomos 13, 18 e 21, respectivamente. É importante ressaltar que esses marcadores indicam quais são os melhores para serem utilizadas na população brasileira visto que essa frequência indica a proporção de heterozigose com alta taxa de marcadores informativos o que resulta em melhores diagnósticos. O marcador também D21S11 apresenta altas taxas de heterozigosidade na população indiana (93,6%)(61).

O método pode ser feito em pequenas amostras, geralmente 1 mL já é suficiente (66). Pode ser feito uma única reação com todos os marcadores a serem analisados, isto faz com que o tempo gasto na metodologia seja menor se comparado a outros métodos de diagnóstico. Além do mais, esse teste é de fácil automação, reduzindo ainda mais o tempo até a liberação do resultado. Os resultados podem ser liberados entre 24 a 72 horas após a coleta das amostras, isso só dependerá do número de capilares existentes no sequenciador do laboratório. No nosso laboratório, o sequenciador ABI 3130 continha 4 capilares e foram processadas 96 amostras por dia.

Caso ocorra falha de amplificação das amostras, o que geralmente representa 1% dos casos ou menos (21, 65), as amostras podem ser analisadas novamente em um curto período de tempo. Marcadores de mutações pontuais podem ser incluídos na metodologia

aumentado o leque de doenças testadas, principalmente, se houver casos conhecidos dessas mutações na família o que levará a uma maior eficácia de diagnóstico.

As opiniões são bem divididas quando se trata em manter a QF-PCR como teste único de detecção de aneuploidias. Ogilvie et. al. (2003) (81), sugeriu substituir o cariótipo pela QF-PCR e disse que nesse método molecular as vantagens da técnica superam as desvantagens. Entretanto, alguns autores afirmam que a substituição total da citogenética pode acabar resultando em um grande número de fetos afetados sem diagnóstico (20, 65, 82).

Quando o resultado da QF-PCR é normal, porém, os exames não-invasivos apresentaram resultados anormais deve-se fazer o cariótipo fetal, pois, é provável, que o feto seja afetado por alguma alteração que não é detectada pela QF-PCR. Sabe-se que, a combinação de diversos métodos não-invasivos e invasivos durante o triagem pré-natal leva a um diagnóstico mais preciso.

As amostras para utilização na QF-PCR são coletadas através de procedimentos invasivos. Isso representa uma desvantagem do método, pois, nem todos os casais estão preparados para se submeter a esse tipo de procedimento. O risco de aborto pós procedimento representa 1% e, embora seja considerado baixo, contudo, deve ser levado em conta.

O teste não pode detectar alterações em cromossomos que não estão contidos na amostras, o que acaba por limitar algumas alterações. Em locais nos quais não há o sequenciador a implantação desse teste pode ser cara e inviável. Recomenda-se também que o local contenha uma demanda de pelo menos 100 amostras a ser analisadas por dia para que o custo benefício seja válido.

A QF-PCR é um teste rápido, robusto e eficaz. Esta metodologia é de fácil implantação e visa diminuir a demanda dos testes citogenéticos, aumentar a eficácia dos diagnósticos e diminuir o tempo de liberação dos resultados. Devemos analisar a possibilidade de implantação dessa metodologia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) como forma de complemento à citogenética no diagnóstico de aneuploidias fetais.

Conclusão

7. Conclusão

1. Foi possível detectar 93% de todas as alterações cromossômicas presentes nas amostras de líquido amniótico obtidas de gestante de risco utilizando a metodologia da QF-PCR.
2. O teste apresentou 90% de sensibilidade e 97,2% de especificidade nesta amostragem em comparação a 100% de sensibilidade e especificidade encontradas pela citogenética.

Anexos

8. Anexos

8.1 –Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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 Obstetrícia e Ginecologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

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 B - Aprovação na CAPpesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0789/08

Título: INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE PLAC4 NA POPULAÇÃO BRASILEIRA.

Pesquisador Responsável: Mário Henrique Burlacchini de Carvalho

Pesquisador Executante: Renata Moscolini Romão

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 04/09/2013, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

•Carta datada de 20.08.13 - Solicitação dos subprojetos: "Desenvolvimento e validação de um teste para a trissomia do cromossomo 21 através da análise de ácidos nucleicos no plasma materno por sequenciamento de última geração", tese de doutorado de Renata Moscolini Romão; e "Implantação e validação de teste QF-PCR para detecção de aneuploidias no ambulatório de Obstetrícia e Ginecologia HC-FMUSP", tese de mestrado de Renata Wendel de Moraes

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) a elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 05 de Setembro de 2013

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Referências

9. Referências*

1. Dashe JS. Aneuploidy Screening in Pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2016;128(1):181-94.
2. Faas BH, Cirigliano V, Bui TH. Rapid methods for targeted prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2011;16(2):81-7.
3. Hixson L, Goel S, Schuber P, Faltas V, Lee J, Narayakkadan A, et al. An Overview on Prenatal Screening for Chromosomal Aberrations. *J Lab Autom*. 2015;20(5):562-73.
4. Asim A, Kumar A, Muthuswamy S, Jain S, Agarwal S. "Down syndrome: an insight of the disease". *J Biomed Sci*. 2015;22:41.
5. Park SY, Jang IA, Lee MA, Kim YJ, Chun SH, Park MH. Screening for chromosomal abnormalities using combined test in the first trimester of pregnancy. *Obstet Gynecol Sci*. 2016;59(5):357-66.
6. Hultén MA, Dhanjal S, Pertl B. Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction*. 2003;126(3):279-97.
7. Putzova M, Soldatova I, Pecnova L, Dvorakova L, Jencikova N, Goetz P, et al. QF-PCR-based prenatal detection of common aneuploidies in the Czech population: five years of experience. *Eur J Med Genet*. 2008;51(3):209-18.
8. Bernal LM, López G. Diagnóstico pré-natal: retrospectiva. *NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 2014:23-36.
9. Davis C, Cuckle H, Yaron Y. Screening for Down syndrome--incidental diagnosis of other aneuploidies. *Prenat Diagn*. 2014;34(11):1044-8.
10. Cuckle H. Prenatal Screening Using Maternal Markers. *J Clin Med*. 2014;3(2):504-20.
11. Hills A, Donaghue C, Waters J, Waters K, Sullivan C, Kulkarni A, et al. QF-PCR as a stand-alone test for prenatal samples: the first 2 years' experience in the London region. *Prenat Diagn*. 2010;30(6):509-17.
12. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet*. 2001;2(4):280-91.

* 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. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005

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

13. Kohatsu M, Burlacchini de Carvalho MH, Francisco RPVF, Amorim Filho AGd, Zugaib M. Análise dos resultados maternos e fetais dos procedimentos invasivos genéticos fetais: um estudo exploratório em Hospital Universitário. *Rev Assoc Med Bras*. 2012;703-8.
14. Mansfield ES. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum Mol Genet*. 1993;2(1):43-50.
15. Cirigliano V, Lewin P, Szpiro-Tapies S, Fuster C, Adinolfi M. Assessment of new markers for the rapid detection of aneuploidies by quantitative fluorescent PCR (QF-PCR). *Ann Hum Genet*. 2001;65(Pt 5):421-7.
16. Cirigliano V, Ejarque M, Cañadas MP, Lloveras E, Plaja A, Perez MM, et al. Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies. *Mol Hum Reprod*. 2001;7(10):1001-6.
17. Cirigliano V, Ejarque M, Cañadas Cingliam P, Fuster C. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies. *Lancet*. 2002;359(9304):442-3.
18. Cirigliano V, Ejarque M, Fuster C, Adinolfi M. X chromosome dosage by quantitative fluorescent PCR and rapid prenatal diagnosis of sex chromosome aneuploidies. *Mol Hum Reprod*. 2002;8(11):1042-5.
19. Cirigliano V, Voglino G, Cañadas MP, Marongiu A, Ejarque M, Ordoñez E, et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18,000 consecutive clinical samples. *Mol Hum Reprod*. 2004;10(11):839-46.
20. Cirigliano V, Voglino G, Adinolfi M. Non-invasive screening and rapid QF-PCR assay can greatly reduce the need for conventional cytogenetic analyses in prenatal diagnosis. *Reprod Biomed Online*. 2005;11(6):671-3.
21. Cirigliano V, Voglino G, Marongiu A, Cañadas P, Ordoñez E, Lloveras E, et al. Rapid prenatal diagnosis by QF-PCR: evaluation of 30,000 consecutive clinical samples and future applications. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1075:288-98.
22. Cirigliano V, Voglino G, Ordoñez E, Marongiu A, Paz Cañadas M, Ejarque M, et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience. *Prenat Diagn*. 2009;29(1):40-9.
23. Donaghue C, Mann K, Docherty Z, Ogilvie CM. Detection of mosaicism for primary trisomies in prenatal samples by QF-PCR and karyotype analysis. *Prenat Diagn*. 2005;25(1):65-72.
24. Donaghue C, Mann K, Docherty Z, Mazzaschi R, Fear C, Ogilvie C. Combined QF-PCR and MLPA molecular analysis of miscarriage products: an efficient and robust alternative to karyotype analysis. *Prenat Diagn*. 2010;30(2):133-7.
25. Mann K, Fox SP, Abbs SJ, Yau SC, Scriven PN, Docherty Z, et al. 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;358(9287):1057-61.

26. Mann K, Petek E, Pertl B. Prenatal detection of chromosome aneuploidy by quantitative fluorescence PCR. *Methods Mol Biol*. 2008;444:71-94.

27. Mann K, Petek E, Pertl B. Prenatal detection of chromosome aneuploidy by quantitative-fluorescence PCR. *Methods Mol Biol*. 2011;688:207-26.

28. Mann K, Ogilvie CM. QF-PCR: application, overview and review of the literature. *Prenat Diagn*. 2012;32(4):309-14.

29. Mann K, Hills A, Donaghue C, Thomas H, Ogilvie CM. Quantitative fluorescence PCR analysis of >40,000 prenatal samples for the rapid diagnosis of trisomies 13, 18 and 21 and monosomy X. *Prenat Diagn*. 2012;32(12):1197-204.

30. O'Brien AL, Dall'Asta A, Tapon D, Mann K, Ahn JW, Ellis R, et al. Gestation related karyotype, QF-PCR and CGH-array failure rates in diagnostic amniocentesis. *Prenat Diagn*. 2016.

31. Ogilvie CM, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Mann K. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy using quantitative fluorescence-PCR (QF-PCR). *J Histochem Cytochem*. 2005;53(3):285-8.

32. Ogilvie C, Mann K. Discrepancies between direct QF-PCR of chorionic villi and karyotype analysis of chorionic mesenchyme cells. *Prenat Diagn*. 2012;32(5):501-2; author reply 4-5.

33. Liao C, Li DZ. Should sex chromosomes be excluded from use in QF-PCR in prenatal samples with a molecular referral? *Am J Med Genet A*. 2014;164A(9):2404-6.

34. Langlois S, Duncan A. Use of a DNA method, QF-PCR, in the prenatal diagnosis of fetal aneuploidies. *J Obstet Gynaecol Can*. 2011;33(9):955-60.

35. Tjio JH, Puck TT. THE SOMATIC CHOMOSOMES OF MAN. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1958;44(12):1229-37.

36. Ogilvie CM, Lashwood A, Chitty L, Waters JJ, Scriven PN, Flinter F. The future of prenatal diagnosis: rapid testing or full karyotype? An audit of chromosome abnormalities and pregnancy outcomes for women referred for Down's Syndrome testing. *BJOG*. 2005;112(10):1369-75.

37. Dutta UR. The history of human cytogenetics in India-A review. *Gene*. 2016;589(2):112-7.

38. Garcia-Sagredo JM. Fifty years of cytogenetics: a parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1779(6-7):363-75.

39. Shaffer LG, Bui TH. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2007;145C(1):87-98.

40. Gekas J, van den Berg DG, Durand A, Vallée M, Wildschut HI, Bujold E, et al. Rapid testing versus karyotyping in Down's syndrome screening: cost-effectiveness and detection of clinically significant chromosome abnormalities. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(1):3-9.
41. Škerget AE, Herodež SS, Zagorac A, Zagradišnik B, Mujezinović F, Vokač NK. Slovenian five-year experiences with rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies using quantitative-fluorescence polymerase chain reaction. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2013;17(9):669-74.
42. Onay H, Ugurlu T, Aykut A, Pehlivan S, Inal M, Tinar S, et al. Rapid prenatal diagnosis of common aneuploidies in amniotic fluid using quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Gynecol Obstet Invest.* 2008;66(2):104-10.
43. Pertl B, Pieber D, Lercher-Hartlieb A, Orescovic I, Haeusler M, Winter R, et al. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy by quantitative fluorescent PCR on fetal samples from mothers at high risk for chromosome disorders. *Mol Hum Reprod.* 1999;5(12):1176-9.
44. Chen CP, Chang SD, Chueh HY, Su YN, Su JW, Chern SR, et al. Rapid positive confirmation of trisomy 21 mosaicism at amniocentesis by interphase FISH, QF-PCR and aCGH on uncultured amniocytes. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2012;51(3):475-80.
45. Kong X, Li L, Sun L, Fu K, Long J, Weng X, et al. Rapid diagnosis of aneuploidy using segmental duplication quantitative fluorescent PCR. *PLoS One.* 2014;9(3):e88932.
46. Long J, Ye X, Weng X, Fu K, Sun L, Pang W. Rapid diagnosis of aneuploidy in chromosomes 13, 18, 21, X and Y by quantitative fluorescence-PCR combined with short tandem repeat and fluorescence-labeled homologous gene quantitative-PCR using 4-color fluorescently labeled universal primers. *Mol Med Rep.* 2013;8(5):1601-5.
47. Guzel A, Yilmaz M, Demirhan O, Pazarbasi A, Kocaturk-Sel S, Erkoç M, et al. Rapid detection of fetal aneuploidies by quantitative fluorescent-polymerase chain reaction for prenatal diagnosis in the Turkish population. *Balkan J Med Genet.* 2012;15(1):11-7.
48. Pertl B, Kopp S, Kroisel PM, Tului L, Brambati B, Adinolfi M. Rapid detection of chromosome aneuploidies by quantitative fluorescence PCR: first application on 247 chorionic villus samples. *J Med Genet.* 1999;36(4):300-3.
49. Comas C, Echevarria M, Carrera M, Serra B. Rapid aneuploidy testing versus traditional karyotyping in amniocentesis for certain referral indications. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010;23(9):949-55.
50. Verma L, Macdonald F, Leedham P, McConachie M, Dhanjal S, Hultén M. Rapid and simple prenatal DNA diagnosis of Down's syndrome. *Lancet.* 1998;352(9121):9-12.
51. Beaudet AL. Using fetal cells for prenatal diagnosis: History and recent progress. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2016;172(2):123-7.

52. Nakonieczny M, Jezierski G, Woźniak I, Liss J, Pawłowski R, Preis K, et al. [Prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies using quantitative fluorescent PCR (QF-PCR)]. *Przegl Lek.* 2008;65(3):119-21.
53. Łaczmańska I, Stembalska A. [New molecular methods in prenatal invasive diagnostics]. *Ginekol Pol.* 2013;84(10):871-6.
54. Xu AQ, Bian XM, Liu JT, Yao FX, Zhang WM, Hao N, et al. [Establishment of multiple quantitative fluorescent polymerase chain reaction assay and its application in rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2010;45(7):481-7.
55. Lu YP, Cheng J, Jiang SF, Zhang LW, Gao ZY, Han B, et al. [Development of multiple quantitative fluorescent PCR for rapid diagnosis of common aneuploidy and its clinical application]. *Yi Chuan.* 2010;32(11):1141-6.
56. Wu Z, Liu N, Zhao Y, Zhao Z, Kong X. [Detection of chromosome aneuploidies in spontaneous abortion villus samples by quantitative fluorescence PCR]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2016;33(2):227-30.
57. Liu X, Zhang Y, Cui W, He R, Zhao Y. [Application of quantitative fluorescence PCR for the prenatal diagnosis of common fetal chromosomal aneuploidies]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2015;32(5):635-40.
58. Hu T, Liu H, Zhu H, Wang J, Zhang H, Zhu Q, et al. [Application of multiple quantitative fluorescence polymerase chain reaction approach for rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2014;31(2):214-8.
59. Wang J, Cui YX. [Advances in rapid prenatal detection of fetal chromosome abnormalities]. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2010;16(4):359-63.
60. Muthuswamy S, Bhalla P, Agarwal S, Phadke SR. Performance of QF-PCR in targeted prenatal aneuploidy diagnosis: Indian scenario. *Gene.* 2015;562(1):55-61.
61. Jain S, Panigrahi I, Gupta R, Phadke SR, Agarwal S. Multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction for detection of aneuploidies. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012;16(6):624-7.
62. Sahlin E, Gustavsson P, Liedén A, Papadogiannakis N, Bjärebörn L, Pettersson K, et al. Molecular and cytogenetic analysis in stillbirth: results from 481 consecutive cases. *Fetal Diagn Ther.* 2014;36(4):326-32.
63. Nasiri H, Noori-Dalooi MR, Dastan J, Ghaffari SR. Investigation of QF-PCR Application for Rapid Prenatal Diagnosis of Chromosomal Aneuploidies in Iranian Population. *Iran J Pediatr.* 2011;21(1):15-20.
64. Baig S, Ho SS, Ng BL, Chiu L, Koay ES, Leow GH, et al. Development of quantitative-fluorescence polymerase chain reaction for the rapid prenatal diagnosis of common chromosomal aneuploidies in 1,000 samples in Singapore. *Singapore Med J.* 2010;51(4):343-8.

65. Nicolini U, Lalatta F, Natacci F, Curcio C, Bui TH. The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration. *Hum Reprod Update*. 2004;10(6):541-8.
66. Schmidt W, Jenderny J, Hecher K, Hackelöer BJ, Kerber S, Kochhan L, et al. Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. *Mol Hum Reprod*. 2000;6(9):855-60.
67. Levett LJ, Liddle S, Meredith R. A large-scale evaluation of amnio-PCR for the rapid prenatal diagnosis of fetal trisomy. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2001;17(2):115-8.
68. Rahil H, Solassol J, Philippe C, Lefort G, Jonveaux P. Rapid detection of common autosomal aneuploidies by quantitative fluorescent PCR on uncultured amniocytes. *Eur J Hum Genet*. 2002;10(8):462-6.
69. Badenas C, Rodríguez-Revenga L, Morales C, Mediano C, Plaja A, Pérez-Iribarne MM, et al. Assessment of QF-PCR as the first approach in prenatal diagnosis. *J Mol Diagn*. 2010;12(6):828-34.
70. Brown L, Abigania M, Warburton D, Brown S. Validation of QF-PCR for prenatal aneuploidy screening in the United States. *Prenat Diagn*. 2006;26(11):1068-74.
71. Cho EH, Park BY, Kang YS, Lee EH. Validation of QF-PCR in a Korean population. *Prenat Diagn*. 2009;29(3):213-6.
72. Atef SH, Hafez SS, Mahmoud NH, Helmy SM. Prenatal diagnosis of fetal aneuploidies using QF-PCR: the egyptian study. *J Prenat Med*. 2011;5(4):83-9.
73. Xu AQ, Xia M, Liu JT, Yao FX, Zhang WM, Hao N, et al. Validation of quantitative fluorescent-PCR for rapid prenatal diagnosis of common aneuploidies in the Chinese population. *Genet Mol Res*. 2013;12(4):6379-88.
74. Liao C, Li DZ. Acceptability of supplementary QF-PCR among women undergoing prenatal diagnosis in mainland China. *Prenat Diagn*. 2012;32(8):813-4.
75. Liao C, Yi CX, Li FT, Li DZ. The prevalence of non-detectable chromosomal abnormalities by QF-PCR in amniocentesis for certain referral indications: experience at a mainland Chinese hospital. *Arch Gynecol Obstet*. 2014;289(1):75-8.
76. Papoulidis I, Siomou E, Sotiriadis A, Efstathiou G, Psara A, Sevastopoulou E, et al. Dual testing with QF-PCR and karyotype analysis for prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities. Evaluation of 13,500 cases with consideration of using QF-PCR as a stand-alone test according to referral indications. *Prenat Diagn*. 2012;32(7):680-5.
77. Konjhodzic R, Dervovic E, Kurtovic-Basic I, Stomornjak-Vukadin M, Muhic A, Baljevic S, et al. Use of Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction (QF PCR) in Prenatal Diagnostic of Fetal Aneuploidies in a 17 Month Period in Parallel with Karyotyping. *Acta Inform Med*. 2014;22(2):86-8.

78. Lildballe DL, Vogel I, Petersen OB, Vestergaard EM. Diagnostic performance of quantitative fluorescence PCR analysis in high-risk pregnancies after combined first-trimester screening. *Dan Med J*. 2014;61(11):A4964.
79. de la Paz-Gallardo MJ, García FS, de Haro-Muñoz T, Padilla-Vinuesa MC, Zafra-Ceres M, Gomez-Capilla JA, et al. Quantitative-fluorescent-PCR versus full karyotyping in prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies in southern Spain. *Clin Chem Lab Med*. 2015;53(9):1333-8.
80. Rostami P, Valizadegan S, Ghalandary M, Mehrjouy MM, Esmail-Nia G, Khalili S, et al. Prenatal Screening for Aneuploidies Using QF-PCR and Karyotyping: A Comprehensive Study in Iranian Population. *Arch Iran Med*. 2015;18(5):296-303.
81. Ogilvie CM. Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: past, present and future. *Pathol Biol (Paris)*. 2003;51(3):156-60.
82. Caine A, Maltby AE, Parkin CA, Waters JJ, Crolla JA, (ACC) UAoCC. Prenatal detection of Down's syndrome by rapid aneuploidy testing for chromosomes 13, 18, and 21 by FISH or PCR without a full karyotype: a cytogenetic risk assessment. *Lancet*. 2005;366(9480):123-8.