



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM GENÉTICA

**DETERMINAÇÃO PRÉ-NATAL DO SEXO PELA ANÁLISE
DE DNA FETAL LIVRE EM PLASMA MATERNO**

Goiânia – GO

©2017

KELLER GABRIEL MARTINS

**DETERMINAÇÃO PRÉ-NATAL DO SEXO PELA ANÁLISE
DE DNA FETAL LIVRE EM PLASMA MATERNO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação
Mestrado em Genética – MGene da Pontifícia Universidade
Católica, como parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Genética

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva

Co-Orientadora: Profa. Dra. Emília Oliveira Alves Costa

Goiânia – GO

©2017

M382d	<p data-bbox="555 1285 1315 1469">Martins, Keller Gabriel Determinação pré-natal do sexo pela análise de DNA fetal livre de plasma materno[manuscrito]/ Keller Gabriel Martins.-- 2017. 56 f.; il. 30 cm</p> <p data-bbox="603 1509 1235 1581">Texto em português com resumo em Inglês Dissertação (mestrado) - Pontifícia Universidade</p> <p data-bbox="336 1585 448 1617">Católica</p> <p data-bbox="529 1621 1209 1724">de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética, Goiânia, 2017 Inclui referências f. 42-47</p> <p data-bbox="523 1765 1331 1868">1. Cuidado pré-natal. 2. Cromossomos. 3. Genética. 4. DNA recombinante. I.Silva, Cláudio Carlos da. II.Pontifícia Universidade Católica de Goiás. III. Título.</p> <p data-bbox="1066 1912 1200 1944">CDU: Ed.</p> <p data-bbox="336 1948 539 1980">577.213.3(043)</p>
-------	--



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1070 • Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br • prope@pucgoias.edu.br

ATA COMPLEMENTAR Nº 136/2017

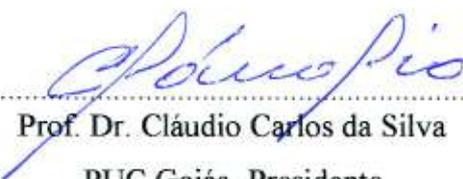
MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: Keller Gabriel Martins

DEFENDIDA EM 04 DE AGOSTO DE 2017 E Aprovado COM CONCEITO A

O título foi alterado (X) não () sim _____

BANCA EXAMINADORA


.....
Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva
PUC Goiás -Presidente


.....
Profa Dra. Lysa Bernardes Minasi
PUC Goiás


.....
Prof. Dr. Marc Alexandre Duarte Gigonzac
Membro externo (UEG)

Agradecimentos

Agradeço acima de tudo a Deus.

Aos meus pais, José Gabriel do Vale e Sinaíra Martins do Vale, à minha esposa, Weruska Gomide B. M. Martins, aos meus filhos, Maria Gabriela de Melo Martins, João Vitor de Melo Martins e Pedro Artur de Melo Martins, aos meus irmãos, Kênia Martins do Vale, Kleberon Henrique Martins do Vale e Kássio Cândido Martins do Vale, e a todos os demais membros da minha família, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva, pela excelente orientação e por todo o tempo que dedicou a me ajudar durante o processo de realização deste trabalho.

À minha Co-Orientadora, Profa. Dra. Emília Oliveira Alves Costa, pela disposição, paciência e dedicação.

À PUC Goiás e todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Genética - MGene, por proporcionarem um ensino de extrema qualidade.

À banca de defesa, Profa. Dra. Lysa Bernardes Minasi, Prof. Dr. Marc Alexandre Duarte Gigonzac e Profa. Dra. Thaís Cidália Vieira, por aceitarem compartilhar seus conhecimentos e enriquecer este estudo com suas considerações.

À minha diretora, Profa. Meire Lúcia dos Santos e todos os colegas, que de alguma forma, me ajudaram a alcançar este objetivo pessoal.

À Lilian de Souza Teodoro e Jonas Garcia de Almeida, MsC. companheiros durante a elaboração deste estudo, não só pelo incansável esforço e trabalho dedicados, mas pela amizade construída.

Ao Rodrigo Tormin Almeida, pela paciência e compreensão durante todo este período de estudo.

A todos que, direta ou indiretamente fizeram parte dessa etapa em minha vida.

Por fim, às gestantes, que em momentos relevantes de suas vidas, permitiram e contribuíram de forma generosa para o desenvolvimento desta pesquisa.

Sumário

Tabelas e Figuras.....	vii
Siglas e Abreviaturas.....	viii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	
2.1. Rastreamento e Diagnóstico Pré-Natal.....	17
2.3. PCR em Tempo Real (qPCR).....	20
2.4. Sexagem Fetal.....	22
2.5. O Cromossomo Y (sequência Y específica).....	22
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo Geral.....	24
3.2. Objetivos Específicos.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1. Delineamento do Estudo.....	25
4.2. Considerações Éticas.....	25
4.3. Critérios de Inclusão.....	25
4.4. Critérios de Exclusão.....	25
4.5. Grupo Amostral.....	26
4.6. Coleta de Dados e Material Biológico.....	26
4.7. Separação do Plasma Materno.....	27
4.8. Extração e purificação do DNA.....	27
4.9. Quantificação (qPCR).....	27
4.10. Estimativa da Sensibilidade, Especificidade e Acurácia.....	28
4.11. Análise Estatística.....	29
5. RESULTADOS.....	30
6. DISCUSSÃO.....	35
7. CONCLUSÃO.....	41

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
9. APÊNDICE	
9.1. Questionário.....	48
9.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	50
9.3. Termo de Aceite do Comitê de Ética.....	51

Tabelas

Tabela 1.	Tabela Descritivas Desconsiderando os Dois Abortos.....	29
Tabela 2.	Resultado da análise de concordância do resultado da PCR com o sexo da criança confirmado.....	30
Tabela 3.	Matriz de correlação de Spearman para análise de associação entre variáveis.....	32
Tabela 4.	Resultado da comparação (Teste de Mann-Whitney) da idade materna e demais variáveis com o resultado da qPCR e o sexo da criança determinado pela USG.....	32
Tabela 5.	Valores estimados para a Sensibilidade (S), Especificidade (E) e Acurácia (A) dos testes de determinação do sexo em DNA fetal livre presente no plasma materno utilizando a metodologia qPCR.....	33

Figuras

Figura 1.	Ilustração da amniocentese. Procedimento destinado à coleta de líquido amniótico para avaliação diagnóstica Pré-Natal.....	12
Figura 2.	Ilustração de uma biópsia de Vilosidade Coriônica para coleta de amostras fetais. Em [A] método Transcervical e em [B] método Abdominal.....	13
Figura 3.	Ilustração de uma cordocentese. Procedimento destinado à obtenção de amostra de sangue fetal.....	13
Figura 4.	Ideograma do Cromossomo Y evidenciando os loci das sequências Y-específicas. As setas indicam o gene <i>SRY</i> e o marcador multi-cópias <i>DYS14</i> localizado no gene <i>TSPY</i>	22
Figura 5.	Formulação para a avaliação da Sensibilidade (S), Especificidade (E) e Acurácia (A) para os testes de diagnóstico.....	27
Figura 6.	Porcentagem dos resultados de sexagem fetal no plasma materno por qPCR. O resultado incerto refere-se à discordância da qPCR com o resultado da USG.....	30
Figura 7.	Resultados da qPCR na Determinação Pré-Natal do Sexo pela Análise de DNA Fetal Livre em Plasma Materno. Em [A] representação gráfica das amplificações obtidas utilizando PCR quantitativa em tempo real para quantificação de DNA humano em região autônoma de múltiplas cópias com 146pb do genoma humano – Controle da Reação. Em [B] representação gráfica da qPCR para quantificação da região <i>DYS14</i> (marcador de múltiplas cópias com 129pb do gene <i>TSPY</i> – codifica proteína testículo-específica localizado no cromossomo Y). Cada reação particular é dependente de uma quantidade alvo específica de DNA marcada por fluorescência separadamente – FAM em [A] e Cy5 em [B].....	31

Siglas e Abreviaturas

BD	do inglês, <i>Beckton-Dickinson</i>
CONEP	Comitê Nacional de Ética em Pesquisa
CT	Ciclo de <i>Threshold</i>
cffDNA	do inglês, <i>Cell Free Fetal DNA</i> (DNA Fetal Livre e Circulante)
DNA	do inglês, <i>Desoxiribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DPIN	do inglês, <i>Non-invasive Prenatal Diagnosis</i> (Diagnóstico Pré-Natal Não-Invasivo)
DYS-14	Marcador de múltiplas cópias do gene <i>TSPY</i> localizado no cromossomo Y
EDTA	do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiaminotetraacético)
HAC	Hiperplasia Adrenal Congênita
kb	Kilobase
mL	Mililitro
Pb	Pares de Bases
PCR	do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
qPCR	PCR-Quantitativa
RPM	Rotação por Minuto
<i>SRY</i>	do inglês, <i>Sex-Determining Region of the Y chromosome</i> (Gene de uma região do cromossomo Y que determina o sexo)
<i>TSPY</i>	do inglês, <i>Testis-specific Protein, Y-encoded</i> (Gene que codifica uma proteína testículo-específica localizado no cromossomo Y)
Yp	Braço Curto do Cromossomo Y
Yq	Braço Longo do Cromossomo Y
°C	Grau Celsius
USG	Ultrassonografia

Resumo

A determinação do sexo fetal utilizando o plasma materno é um teste de diagnóstico pré-natal não invasivo (DPIN), oferecido as gestantes, principalmente para aquelas com risco aumentado de terem crianças com doenças ligadas ao sexo. Por se tratar de uma técnica não invasiva, apresenta-se com maior vantagem sobre outros métodos de diagnóstico pré-natal invasivos como a amniocentese, cordocentese e a biópsia de vilosidades coriônicas. O diagnóstico pré-natal (DPN) tem sido importante no acompanhamento de gestações com anormalidades fetais, além de permitir um planejamento mais adequado para o parto e de cuidados neonatais específicos. Dessa forma, o DPN tem sido estabelecido na prática obstétrica moderna e integra um conjunto de procedimentos para identificar uma anormalidade no feto durante a gravidez. Diversas pesquisas têm buscado a utilização de novas tecnologias para o diagnóstico pré-natal não invasivo (DPNI). O uso de DNA fetal livre (*cffDNA*) no plasma materno passou a ser uma alternativa promissora para diagnóstico do sexo não invasivo e precoce. O objetivo do presente trabalho é realizar um estudo qualitativo em pacientes gestantes, com idade gestacional variando de 6 a 20 semanas utilizando o teste pré-natal não invasivo para a determinação precoce do sexo fetal pela técnica de qPCR. Foram selecionadas 21 gestantes saudáveis, maiores de 18 anos e gestação única e atendidas em clínica de ginecologia e obstetrícia do Centro de Diagnóstico Clínico UNIGEN pertencente à Rede Privada de Atendimento à Saúde da Cidade de Goiânia-GO. Após a coleta de sangue venoso, houve a separação e o congelamento do plasma (-20°C). O material a ser analisado seguiu para o laboratório da empresa Qiagen® localizado em São Paulo-SP, onde foram realizadas a extração e purificação do DNA utilizando equipamento automatizado (QIAcube®, com o kit QIAamp® DNA Micro, empregando-se o protocolo “*Purification of viral nucleic acids from large body-fluid samples*”, conforme especificações do fabricante), e em seguida foi realizada a técnica de PCR quantitativa (Rotor-Gene® Qiagen) para amplificação de sequência Y específica. Das 21 gestantes selecionadas, duas participantes abortaram, sendo dessa forma excluídas do estudo. Os resultados revelaram que dos 19 casos analisados, ao comparar os resultados da qPCR com o sexo fetal determinado pela ultrassonografia (USG), 7/19 (36,8%) gestações com resultados positivos para o cromossomo Y (determinando o sexo Masculino) e 11/19 (57,9%) gestações com resultado negativo para o cromossomo Y (determinando o sexo Feminino) e apenas uma gestação (5,3%) apresentou resultado falso-negativo para o sexo masculino. A análise do índice de concordância, entre os

resultados da qPCR com a USG foi de 0,89. Esses resultados confirmaram uma boa sensibilidade e especificidade do método para o período de gestação estudado (média de 12 semanas), indicando que este procedimento deve ser utilizado na rotina médica como ferramenta auxiliar nos casos onde a sexagem fetal torna-se necessária para tratamento fetal e/ou diminuição da ansiedade dos pais.

Palavras-chave: Sexagem Fetal, DPNI, qPCR, cromossomo Y.

Abstract

The determination of fetal sex using maternal plasma is a noninvasive prenatal diagnostic test (NIPDT), offered to pregnant women, especially those with an increased risk of having children with conditions X-linked inheritance. Because it is a non-invasive technique, it presents a greater advantage over other methods of invasive prenatal diagnosis such as amniocentesis, cordocentesis and biopsy of chorionic villi. The use of cell free fetal DNA (cffDNA) in maternal plasma has become a promising alternative for the diagnosis of noninvasive and early sex determination. The purpose of this study is to conduct a qualitative test in pregnant women with gestational age ranging from 6 to 20 weeks using the noninvasive prenatal test for the early sex determination of fetal by the real time PCR technique. Twenty-one healthy pregnant women, over 18 years of age, single gestation and attended at the Gynecology and Obstetrics Clinic of the Unigen Laboratory belonging to the Private Health Care Network of the City of Goiânia-GO were selected. After venous blood collection, plasma was separated and frozen (-20 ° C). The material to be analyzed followed the laboratory of the company Qiagen® located in São Paulo, SP, where DNA extraction and purification were performed using fully automated equipment (QIAcube®, with the QIAamp® DNA Micro kit, using the protocol "Purification of viral nucleic acids from large body-fluid samples", according to the manufacturer's specifications), and then the quantitative PCR technique (Rotor-Gene® Qiagen) was run for specific Y-sequence amplification. Of the 21 pregnant women selected, two participants aborted and were excluded from the study. The results showed that, in the 19 cases analyzed, comparing the results of qPCR with fetal sex determined by ultrasonography (USG), 7/19 (36.8%) pregnancies with positive results for the Y chromosome (determining the male sex) and 11/19 (57.9%) pregnancies with a negative result for the Y chromosome (determining the female sex) and only one gestation (5.3%) presented false-negative results for males. The analysis of the concordance index, between the results of the qPCR and the USG, found a concordance of 0.89. These results confirmed a good sensitivity and specificity of the method for the gestation period studied (mean of 12 weeks), indicating that this procedure should be used in the medical routine as an auxiliary tool in cases where fetal sexing becomes necessary for health fetal and/or decreased parents anxiety.

Keywords: Fetal sexing, NIPDT, Anxiety parents, Real Time PCR.

1 – INTRODUÇÃO

O Diagnóstico Pré-Natal (DPN) é um protocolo da prática obstétrica moderna que engloba um conjunto de procedimentos para identificar anormalidades no feto durante a gestação (LO, 2012). Além do mais, tem sido muito importante no monitoramento de gestações com anormalidades fetais, permitindo um planejamento mais adequado do parto e de cuidados neonatais específicos (DHALLAN, 2004 & CHIU, 2011). As anomalias fetais afetam cerca de 1% dos recém-nascidos em todo o mundo e está diretamente associado com cerca de 20% da mortalidade infantil durante o primeiro ano de vida (SAYRES;CHO.2011 & FAN et al.2008).

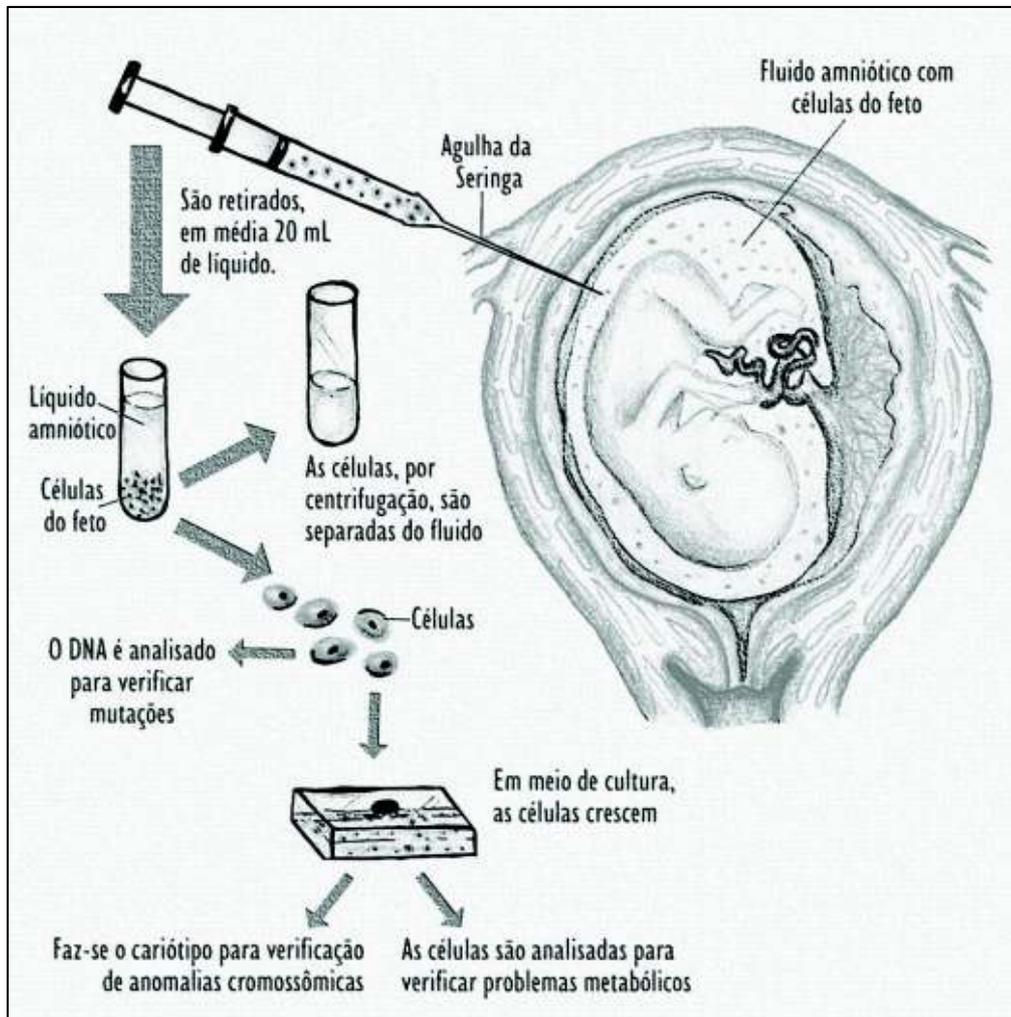
As perdas gestacionais mais frequentes estão relacionadas com a ocorrência de alterações cromossômicas no concepto, que podem ser causa de mais de 80% dos casos de abortos espontâneos (CHOI et al., 2014).

Na maioria dos casos, o diagnóstico pré-natal para a detecção das aneuploidias é a análise do cariótipo em líquido amniótico ou das vilosidades coriônicas, que possuem acurácia elevada, mas são dependentes de procedimentos invasivos de coleta de amostras de material fetal diretamente do útero materno, durante o primeiro e segundo trimestre de gestação. Por serem invasivas, essas abordagens carregam risco de 0,5% - 1,0% de perda da gestação (TABOR & ALFIREVIC, 2010).

Os métodos invasivos, apesar de fornecerem o material necessário para a análise, são arriscados pois podem ocasionar problemas na gestação, juntamente com outras complicações associadas à ruptura de membranas, ocasionando hemorragias, infecções e abortos, e em alguns casos, podem até mesmo, induzir a morte materna (LO, 2012 & HERNANDEZ-ANDRADE, 2002). Entre os métodos invasivos mais utilizados, incluem a Amniocentese, Biópsia de vilosidades coriônicas e Cordocentese (EVANS, 2005).

A amniocentese, conforme apresentada na Figura 01, envolve a punção do âmnio, membrana mais interna em torno do material fetal, para retirada de um determinado volume do líquido amniótico, no qual contém células fetais a serem avaliadas. Este tipo de procedimento é realizado próximo ou na 15ª semana de gestação. No entanto, esta coleta pode ser realizada entre a 10ª e a 14ª semana de gestação. Alguns estudos exemplificaram que, quando realizada nesses períodos, eleva em 2% a taxa de perda gestacional (EISENBERG, 2002 & CASTAÑO, 2010).

Figura 01. Ilustração da amniocentese. Procedimento destinado à coleta de líquido amniótico para avaliação diagnóstica Pré-Natal.

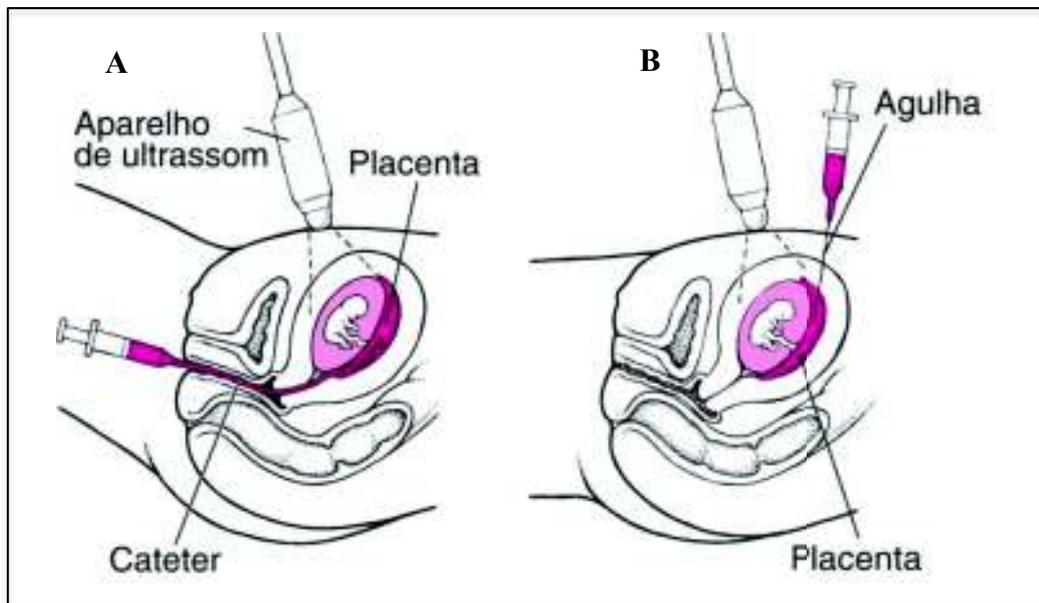


Fonte: <https://prontuarioidmed.websiteseuro.com/imagens/image/i103amniocentese.jpg>

A Biópsia das Vilosidades Coriônicas (BVC), apresentado na Figura 2, consiste na obtenção de material coriônico, rico em células trofoblásticas. A coleta normalmente é realizada por meio da inserção de uma agulha na placenta por via abdominal ou transcervical. Este procedimento permite a obtenção de amostras fetais entre a 10^a e 12^a semana, porém representa um incremento no risco para a mãe e feto (ALFIREVIC, 2009 & MALONE, 2005).

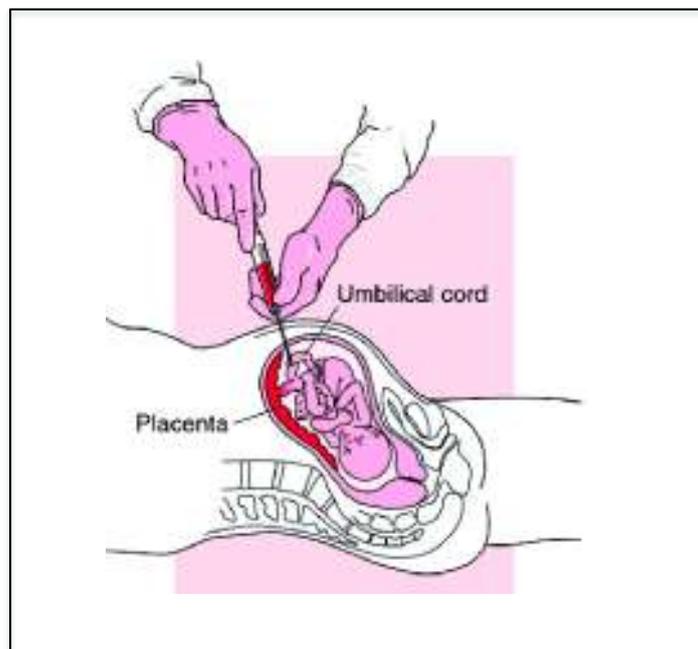
Por outro lado, a cordocentese, indicado na Figura 3, é realizada, na maioria das vezes, a partir da 17^a semana de gestação por meio de uma punção percutânea do cordão umbilical ou da veia femoral, obtendo dessa forma amostras de sangue fetal (MALONE, 2005).

Figura 02. Ilustração de uma biópsia de Vilosidade Coriônica para coleta de amostras fetais. Em [A] método Transcervical e em [B] método Abdominal.



Fonte: http://www.msmanuals.com/~/media/manual/home/images/gyn_detecting_abnormalities_before_birth_pt.gif?la=pt&thn=0

Figura 03. Ilustração de uma cordocentese. Procedimento destinado à obtenção de amostra de sangue fetal.



Fonte: <http://img.tfd.com/mk/S/X2604-S-08.png>

Nos últimos 15 anos, diversos estudos têm buscado a utilização de novas tecnologias para o diagnóstico pré-natal (LEVI, 2003; MARTINHAGO, 2006; AVENT, 2009 & LO, 2006). A descoberta de DNA fetal livre presente na circulação materna abriu um novo horizonte para investigação de técnicas não invasivas (AVENT, 2009).

Tendo como uma metodologia não-invasiva a ultrassonografia ou ecografia, há mais de 30 anos, têm sido utilizadas como importantes ferramentas de diagnóstico na avaliação gestacional. Os principais objetivos destes exames têm sido a observação, por imagem do desenvolvimento fetal, a identificação de possíveis anormalidades (AVNI, 2007).

Os métodos não-invasivos não oferecem riscos maternos e fetais. A ultrassonografia e análise bioquímica de soro materno surgiram como métodos não-invasivos para a triagem de aneuploidias fetais (MALONE, 2005).

As complicações na gestação pelas técnicas tradicionais, como a amniocentese, a biópsia das vilosidades coriônicas e a cordocentese podem ser evitadas pela utilização de células fetais intactas e DNA fetal livre que circulam na corrente sanguínea da gestante (BIANCHI, 2004). Como alternativa a tais metodologias, DNA fetal livre e circulante no plasma materno têm sido intensamente pesquisado nas últimas décadas para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos de diagnóstico pré-natal não invasivo (LO et al. 1998 & LO, 2000).

O primeiro relato de identificação de células fetais na circulação materna foi observado por Schmorl em 1893, que identificou a presença de células trofoblásticas no tecido pulmonar de pacientes que faleciam por pré-eclâmpsia (SCHMORL, 1893).

A liberação de DNA fetal no plasma materno ocorre devido ao contínuo escape de células fetais através da placenta, que são rapidamente destruídas pelo sistema imune materno, liberando o DNA fetal livre na circulação (PERTL, 2001).

As células fetais aparecem na circulação materna precocemente no primeiro trimestre e continuam presentes com o decorrer da gestação. A concentração do DNA fetal no soro e plasma das gestantes aumenta gradativamente durante a gestação e são eliminadas da circulação materna após o parto (AVENT, 2009; RIJNDERS, 2003 & LO, 1999).

O uso de DNA fetal no plasma materno passou a ser uma alternativa promissora para o diagnóstico pré-natal não invasivo e precoce. Desde então, diversos avanços nesta direção têm sido feitos. Além da utilização do DNA fetal livre para a sexagem do embrião e/ou feto, as investigações de algumas desordens genéticas já estão sendo consolidadas na prática clínica (WRIGHT, 2009; DING, 2004).

Métodos utilizando equipamentos de detecção por qPCR (*Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*), possibilitam o menor risco de contaminação e a obtenção de níveis mais altos de sensibilidade (BIANCHI, 2004).

O método qPCR é uma tecnologia de inovação que permite mensurar a taxa de acúmulo de amplificação através da detecção de fluorescência emitida a cada ciclo da reação. Este processo é baseado numa relação quantitativa entre o número de DNA-alvo presente no início da reação de qPCR e o montante de produto amplificado durante a fase exponencial da reação (LIM, 2013 & HEID, 1996).

A descoberta da presença do DNA livre fetal no plasma materno de gestantes trouxe uma grande evolução, sendo um método valioso e acessível para obtenção de material genético fetal, aplicável para diagnóstico e acompanhamento pré-natal. Desde então, diversos avanços nesta direção têm sido feitos (TOUNTA, 2011).

Dessa forma, os esforços iniciais, que eram focadas em isolamento e análise de DNA fetal circulantes, acabaram por ser um desafio. As aplicações clínicas têm sido continuamente ampliadas devido ao avanço da tecnologia de detecção molecular (COSTA, 2002).

Apesar destes avanços técnicos serem promissores, ainda são caros e complexos para a maioria dos laboratórios. Contudo, é necessário simplificar e otimizar os procedimentos para a área clínica. Uma abordagem alternativa para a determinação do sexo fetal e detecção de anomalias fetais seria enriquecer as regiões de interesse (SPARKS, 2012).

Esta tecnologia desempenha um papel cada vez mais importante para a investigação pré-natal de forma segura e precisa (LIM, 2013).

Por motivos práticos a técnica de sexagem fetal utiliza sequências do cromossomo Y em grávidas de fetos masculinos (NICOLAIDES, 2011 & BIANCHI, 1997). Uma vez comprovada a reprodutibilidade e sensibilidade do método, outros alvos estão sendo investigados, entre estes destacam-se a determinação do genótipo Rh(D), a β -talassemia, a acondroplasia e alvos de diagnóstico para a identificação de fetos portadores da síndrome de Down (BIANCHI, 1996 & FAAS, 2012).

2 - REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Investigação e Diagnóstico Pré-Natal

O rastreamento pré-natal é amplamente utilizado para triagem de anormalidades cromossômicas. A síndrome de Down (Trissomia 21), síndrome de Edwards (Trissomia 18) e a síndrome de Patau (Trissomia 13) são os três distúrbios aneuplóides com consequências significativas que podem ser detectados por meio da avaliação pré-natal (RESTA, 2005 & RODECK, 2009).

No entanto, o teste pré-natal é realizado a partir da análise citológica e genética por métodos invasivos e não invasivos (NICOLAIDES, 2011). Os procedimentos convencionais de diagnóstico pré-natal utilizam métodos invasivos. Esses procedimentos trazem um risco pequeno, mas definitivo para o feto, podendo acarretar a perda fetal em torno de 0,5% a 2%, isso reservados apenas para aquelas gestações consideradas de alto risco para doenças cromossômicas como idade materna avançada, história familiar de cromossomopatias, abortos repetidos e presença de malformações ao ultrassom (BIANCHI, 1996; BIANCHI, 1997; FAAS, 2012; LO, 2005 & ALFIREVIC, 2009).

Desenvolver técnicas que possibilitassem o acesso ao material fetal, sem a necessidade de interferência à saúde do feto e da mãe por procedimentos invasivos foi motivado a partir de 1969, quando ficou conhecido que células fetais íntegras atravessavam a barreira placentária e podiam ser encontradas na corrente sanguínea materna (WALKNOWSKA et al., 1969). Em 1997, Lo e colaboradores demonstraram a presença de cfDNA (DNA fetal livre, do inglês *cell free fetal DNA*) originário do cromossomo Y no plasma e no soro de gestantes que carregavam fetos masculinos e estimularam ainda mais o desenvolvimento dessas metodologias como um atrativo recurso de diagnóstico pré-natal não invasivo (BIANCHI, 1999; LO et al. 1998, CHAN et al. 2004).

A partir deste momento, diversos estudos sobre a utilização de material fetal disponível na circulação materna foram publicados em diversas áreas do diagnóstico pré-natal não invasivo, visando sempre a sua aplicabilidade na área clínica, a fim de minimizar os riscos e a necessidade dos procedimentos invasivos (MARTINHAGO et al. 2006).

Inicialmente, os esforços se focaram nas pesquisas sobre a determinação do sexo fetal e na genotipagem do gene *Rh(D)* e resultaram em exames hoje oferecidos por laboratórios acadêmicos e particulares de muitos países, inclusive do Brasil (MARTINHAGO et al. 2006; NEWSON, 2008; HILL et al. 2011).

A partir do século XIX, quando se observou pela primeira vez a presença de células fetais em parênquima pulmonar materno associada à eclampsia (SCHMORL, 1893), a detecção das mesmas em sangue periférico materno permanece com objeto de intensas pesquisas. Após alguns anos, pesquisadores da área de oncologia constataram a presença de DNA tumoral livre no plasma de pacientes com câncer de pâncreas (LEON, 1977 & LO, 2012). Baseados nestes dados, Lo e colaboradores (1997), descobriram a presença de DNA fetal circulando livre no plasma e soro de mulheres grávidas (LO, 1997 & BISCHOFF, 2005).

Neste mesmo estudo foi sugerido que o DNA fetal livre derivado de plasma ou soro materno poderia ser um recurso alternativo não invasivo de obtenção de material fetal para diagnóstico pré-natal. Utilizando amplificação por PCR convencional de sequências específicas do cromossomo Y, Lo e colaboradores (1997) identificaram DNA fetal em amostras de soro e plasma de mulheres grávidas de fetos do sexo masculino (FAAS, 2012; LO, 2006 & WRIGHT, 2009).

Este mesmo grupo em 1998, desenvolveu um trabalho com o objetivo de quantificar a concentração do DNA fetal livre no plasma materno. Foi estimado que a fração da quantidade de DNA fetal livre no início da gestação é em média de 3,4% a 6,2% do total de DNA no plasma materno em gestações do primeiro ao terceiro trimestre (LO, 1998). Constataram também que a concentração média de DNA fetal livre em plasma materno é cerca de 21 vezes maior em comparação com células intactas.

Metodos mais recentes utilizaram equipamentos de detecção em tempo real (qPCR), possibilitando com isso menor risco de contaminação e a obtenção de níveis mais altos de sensibilidade (BIANCHI, 2004). Em 2002 Bischoff, realizou o diagnóstico da trissomia do cromossomo 21 utilizando qPCR em DNA fetal extraído de sangue materno com sensibilidade de 95 a 100% e especificidade de 100% e um menor risco de contaminação (BISCHOFF, 2002).

Durante a gestação, o tecido fetal que fica em contato direto com a circulação sanguínea materna é a placenta. Esta estrutura conecta o feto em desenvolvimento ao organismo materno para permitir a entrada de nutrientes, eliminação de excretas e as trocas gasosas. Ela é composta por uma parte materna: a *decídua* (endométrio durante a gravidez) e por uma parte fetal: a *placa coriônica* (que contém as vilosidades coriônicas). Entre essas duas partes é formada uma lacuna, chamada de espaço intervilososo, que é preenchida por sangue materno. A camada mais externa da placa coriônica é revestida por células

denominadas por trofoblastos, células fetais que ficam em contato direto com o sangue materno (LO, 2000).

A liberação de DNA fetal no plasma materno ocorre devido ao contínuo escape de células fetais (trofoblastos) através da placenta, que são rapidamente destruídas pelo sistema imune materno, liberando o DNA fetal livre na circulação (PERTL, 2001). Adicionalmente, a apoptose das células fetais é também um mecanismo realizado, além dos processos de morte e lise celular (BISCHOFF, 2005 & ANGERT, 2003).

Porém, é importante salientar que os trofoblastos são a maior fonte de ácidos nucleicos fetais na circulação materna, os quais são liberados através da apoptose durante o crescimento e remodelamento placentário, tornando primordial o estudo e compreensão do papel da placenta na fisiopatologia da gestação normal e patológica, aumentando as possibilidades de um potencial método para o diagnóstico pré-natal não invasivo (LITTON, 2009; TOUNTA, 2011; FLORI, 2004 & LICHTENSTEIN, 2001).

Uma análise quantitativa do DNA fetal presente no plasma realizada por Lo e Colaboradores (1998) demonstrou que este pode compor até 3-6% do DNA total presentes no plasma (LO, 1998 & LO, 2012). As células fetais aparecem na circulação materna precocemente no primeiro trimestre e continuam presentes com o decorrer da gestação. A concentração do DNA fetal no soro e plasma das gestantes aumenta gradativamente durante a gestação e são completamente eliminadas da circulação materna após o parto (AVENT, 2009; LO, 1999 & RIJNDERS, 2003). Além disso, a depuração deste material é rápida, com meia vida de 16 minutos, uma média de 4 a 30 minutos (LO, 1998; LO, 1999 & LO 2002).

A detecção qualitativa de sequências de DNA fetal tem implicação prática em diagnósticos moleculares pré-natais de sexagem fetal associada a doenças ligadas ao sexo, genotipagem do *gene Rh(D)*, desordens autossômicas recessivas, como distrofia miotônica, acondroplasia e doença de Huntington ou desordens monogênicas, como a fibrose cística e hemoglobinopatias (LO, 1997; TOUNTA, 2011; COSTA, 2002 & KEYMOLEN, 2007).

O volume de cfDNA no sangue materno é um importante parâmetro que afeta a acurácia dos testes genéticos pré-natais não invasivos, principalmente, porque resultados falso-negativos podem surgir em amostras nas quais há uma fração baixa do DNA fetal (McCULLOUGH et al. 2014).

Apesar do plasma e soro materno conterem DNA fetal livre, o plasma é o material de escolha para uso em diagnóstico pré-natal, pois a concentração de DNA materno misturado ao fetal é menor (SESARINI, 2010).

No entanto, o uso do DNA fetal livre para o rastreamento pré-natal não invasivo ainda é limitado pela pequena porcentagem de DNA fetal livre que é recuperado do plasma das gestantes (BISCHOFF, 2005). A fração de DNA fetal recuperada representa aproximadamente 5 a 10% do total de DNA circulante no plasma materno em gestações de primeiro e terceiro trimestre respectivamente (LO, 1998). Sendo assim, ainda existem desafios técnicos a serem ultrapassados antes da viabilização desta opção como teste pré-natal de rotina.

2.2. A Técnica qPCR (*Real Time Quantitative PCR*)

A qPCR consiste em amplificar e quantificar as cópias de DNA *in vitro* usando os elementos básicos do processo de replicação natural (NASCIMENTO et al., 2010).

Um dos objetivos mais almejado no diagnóstico não invasivo pré-natal ainda é a detecção de sexo fetal e a identificação de aneuploidias (DANIELS, 2009). Assim, ainda é necessário que novas pesquisas desenvolvam caminhos alternativos, com o objetivo de aumentar a detecção da fração fetal que compõe o DNA circulante no sangue de gestantes, permitindo melhor assistência no período pré-natal.

A descoberta do DNA fetal livre circulante no plasma materno tem levado à introdução de novos métodos não invasivos de detecção de sexo fetal e aneuploidias. Nos últimos anos estes métodos tem sido amplamente testado em aplicações clínicas (CHIU, 2012).

O método qPCR é uma tecnologia de inovação com uma metodologia consolidada que permite mensurar a taxa de acúmulo de amplificação através da detecção de fluorescência emitida a cada ciclo da reação (LIM, 2013; HEID, 1996). Este processo é baseado numa relação quantitativa entre o número de DNA-alvo presente no início da reação de PCR e o montante de produto amplificado durante a fase exponencial da reação (SIKORA, 2010).

O qPCR representa um avanço tecnológico, já que esta técnica apresenta a capacidade de gerar resultados quantitativos, permite o acompanhamento da reação e apresenta resultados de forma precisa e rápida, em comparação ao PCR convencional que apresenta resultados apenas de forma qualitativa (PERTL, 2001).

Sendo assim, esta tecnologia desempenha um papel cada vez mais importante para a investigação pré-natal não invasiva (LIM, 2013).

O conceito fundamental para se entender a reação de qPCR é o ciclo de *threshold* (CT). Inicialmente, se determinam os níveis de ruído fluorescente (linha de base ou *baseline*), e a partir desta referência o CT será definido. O CT compreende-se por uma linha de base no intervalo entre 3º a 5º ciclos, precedentes ao primeiro ciclo que se inicia o sinal fluorescente de amplificação. O CT ocorre quando a fluorescência ultrapassa a linha de *threshold*, a qual pode ser fixa ou determinada pelo operador. A linha de *threshold* deve ser determinada na fase exponencial da curva para resultados mais precisos, já que se presume que esta fase seja caracterizada pela eficiência máxima da reação (PERTL, 2001).

A partir do princípio de que a qPCR reflete o número de cópias do DNA-molde, quanto maior a concentração deste DNA, ou quanto maior o número de cópias iniciais, mais precocemente vai aparecer à fluorescência e conseqüentemente, menor será o valor obtido do CT (LIM, 2013).

Outra definição importante em qPCR é o ΔR_n (*baseline corrected normalized fluorescence*), que nada mais é do que a fluorescência basal emitida naturalmente pela reação e os reagentes. Quanto maior o ΔR_n mais robusta e eficiente foi a reação. O valor do ΔR_n depende de vários fatores, dentre os mais importantes estão o desenho dos *primers* e a sonda, determinando a eficiência da reação, concentração de *primers* e sonda e o conjunto de todos os demais reagentes, ou seja, reflete diretamente a eficácia com que a reação foi realizada (SIKORA, 2010).

O uso da qPCR na determinação do sexo fetal pelo sangue materno, tem o objetivo de quantificar o DNA fetal plasmático, baseado na identificação de sequências específicas do cromossomo sexual Y, na qual apresenta uma sensibilidade de 95% de especificidade (BISCHOFF, 2002 & ZOLOTUKHINA, 2005).

Conseqüentemente a metodologia da qPCR oferece dados em tempo real e, possui um sistema fechado, sendo menos susceptível a contaminação. Além disso, é uma metodologia que mostra resultados quantitativos. Isto demonstra seu emprego em vários estudos na determinação e na concentração de DNA fetal livre em plasma materno. Além disso, é sensível o suficiente para detectar o DNA de uma única cópia (PERTL, 2001 & SIKORA, 2010).

2.3. Sexagem Fetal

Uma das aplicações mais avançadas de cfDNA para o diagnóstico pré-natal é a determinação do sexo fetal para gestações com alto risco de doenças ligadas ao X e ou doenças endócrinas masculinizantes (exemplo, hiperplasia congênita da supra renal), a fim de reduzir a necessidade de testes invasivos e tratamentos desnecessários (ZOLOTUKHINA, 2005).

Os processos de determinação e diferenciação sexuais estão intrinsecamente associados à presença ou à ausência do cromossomo Y. Com a descoberta de que o DNA fetal circula no plasma materno proporcionou a análise do sexo do feto a partir do plasma da mãe. Homens apresentam os cromossomos sexuais X e Y, enquanto as mulheres apresentam dois cromossomos X, sendo assim fica clara a estratégia utilizada para a sexagem fetal. A análise é realizada extraíndo-se DNA livre do plasma materno e amplificando sequências específicas do cromossomo Y através da técnica da qPCR. As gestantes com feto do sexo masculino (XY) apresentam o exame positivo, com amplificação de sequência específica do cromossomo Y. Já na gestação de um feto feminino (XX), os exames dão resultados negativos, isto é, não apresentam amplificações de sequências específicas do cromossomo Y (BISCHOFF, 2002).

Apesar da tecnologia de amplificação de sequências específicas de DNA, através da técnica qPCR, ser bastante eficiente, existe problema de sensibilidade, já que a quantidade de DNA fetal é muito baixa. Sendo assim, dependendo da concentração de DNA fetal presente no plasma materno podem ser gerados falsos resultados de feto feminino (SEKIZAWA, 2001).

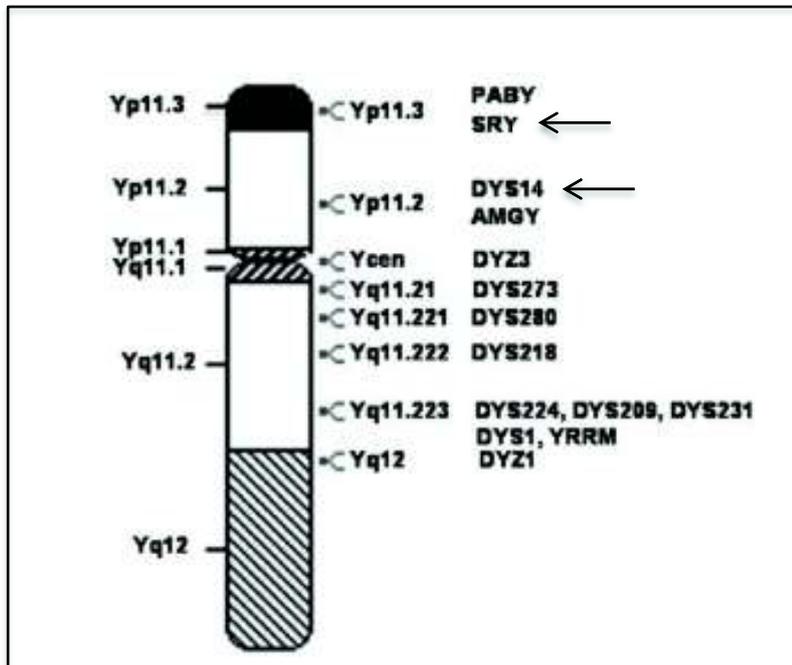
2.4. O cromossomo Y (sequências Y-específicas)

O genoma humano está organizado em 23 pares de cromossomos (22 pares de autossomos e um par de cromossomos sexuais). Cada um dos pais contribui com um par de cromossomos. Os cromossomos X e Y, também conhecidos como os cromossomos sexuais, determinam o sexo biológico de um indivíduo: As fêmeas herdam um cromossomo X do pai para um genótipo XX, enquanto os machos herdam um cromossomo Y do pai para um genótipo XY (mães passam apenas o cromossomo X para os filhos e as filhas). A presença ou ausência do cromossomo Y é crítica, pois este contém os genes necessários para substituir o

padrão biológico – desenvolvimento feminino – e provoca o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino (CAROLINA, 2013).

Diversos estudos sobre a determinação do sexo fetal no plasma materno foram publicados por sequência Y-específica do cromossomo. Alguns marcadores são utilizados para esta finalidade, dentre eles pode-se destacar o gene *SRY* e o *DYS14* marcador de múltiplas cópias do gene *TSPY* – gene que codifica uma proteína testículo-específica localizado no cromossomo Y, conforme apresentado na Figura 4 (DONABELA, 2008).

Figura 4. Ideograma do Cromossomo Y evidenciando os loci das sequências Y-específicas. As setas indicam o gene *SRY* e o marcador multi-cópias *DYS14* localizado no gene *TSPY*.



Fonte: https://www.researchgate.net/profile/Pasquale_Parisi/publication/221833305/figure/fig1/AS:305497912692738@1449847786974/fig-3-Ideogram-of-Y-chromosome-showing-the-loci-of-Y-specific-sequences-included-in-this.png

3 – OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Realizar o teste molecular pré-natal não invasivo para determinação precoce do sexo a partir do DNA fetal livre presente no plasma materno utilizando qPCR.

3.1 - Objetivos Específicos

- Avaliar a sensibilidade, especificidade e acurácia do método em estudo, no período da 6^a a 20^a semanas de gestação;
- Realizar a qPCR do DNA fetal plasmático, baseado na identificação de sequências Y específicas;
- Promover a análise de concordância entre o teste molecular de sexagem fetal com o sexo fetal identificado por ultrassonografia;
- Contribuir para difundir a técnica qPCR na determinação do sexo fetal, tornando este ponto um fator importante no sucesso de testes moleculares de identificação sexual a partir do sangue materno;

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo qualitativo, constituído apenas por pacientes gestantes, com idade gestacional variando de 6 a 20 semanas. O estudo foi conduzido no Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) / Escola de Ciências Agrárias e Biológicas (ECAB) / Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-Goiás), no Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LaGene) / Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Sysneiro (LACEN) / Secretaria de Estado da Saúde do Estado de Goiás (SES-GO), e da empresa QIAGEN® Brasil. Foram convidadas a participar do presente estudo gestantes observadas no Centro de Diagnóstico Clínico UNIGEN situado na rua 9-A nº 626 - Setor Aeroporto, Goiânia-GO.

4.2. Considerações Éticas

Este estudo atendeu as recomendações dispostas na Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da PUC-Goiás e o número do CAAE foi 62563416.4.0000.0037. Todos os procedimentos metodológicos da pesquisa foram esclarecidos pelos pesquisadores e equipe antes e durante a pesquisa para todas as participantes.

4.3. Critérios de Inclusão

- Mulheres grávidas, maiores de 18 anos, com idade gestacional a partir da 6ª semana de gestação;
- Gestação única;
- Gestação sem intercorrência abortiva;
- Mulheres que concordaram, assinaram o TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e responderam o questionário para a obtenção dos dados descritivos.

4.4. Critérios de exclusão

- Mulheres não grávidas ou com idade inferior a 18 anos;
- Gestação gemelar, trigemelar, etc;

- Abortos
- Pacientes que não concordarem em assinar o TCLE e/ou responderem ao questionário para a obtenção dos dados descritivos.

4.5. Grupo amostral

Foram selecionadas 21 gestantes saudáveis a partir da 6ª semana de gestação, maiores de 18 anos e com gestação única. No momento da coleta as participantes voluntariamente responderam um questionário para coleta de dados descritivos e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.6. Coleta de dados e material

Em um primeiro momento foi realizado um encontro com as possíveis participantes da pesquisa, com o intuito de explicar os objetivos e importância da mesma. Após concordância com o estudo, as participantes eram questionadas sobre os pontos de inclusão, e posteriormente dava-se prosseguimento com a apresentação, leitura e assinatura do TCLE. Foi aplicado um questionário para as participantes com o intuito de esclarecer idade gestacional, caso houvesse outras gestações, se a gravidez é de feto único, gemelar ou trigemelar e se teve aborto e se passou por alguma transfusão sanguínea recente. Em seguida foi realizada a venipunção periférica para a obtenção do material biológico dando seguimento as análises genéticas. Todas as atividades foram realizadas em ambiente adequado e com privacidade para todas as participantes.

A coleta de dados e material biológico (Sangue) foram executadas por uma equipe constituída por 1 técnica de laboratório, além do pesquisador responsável, ambos experientes na técnica de venipunção periférica. As coletas ocorreram no laboratório Centro de Diagnóstico Clínico UNIGEN, situado na rua 9-A nº 626 - Setor Aeroporto, Goiânia-GO.

Foram coletadas 5 mL de amostras de sangue materno, por punção venosa, em tubos de EDTA (BD *vacutainer Plus Plastic K2EDTA tubes*®), utilizando agulhas e tubos estéreis e descartáveis.

4.7. Separação do Plasma Materno

As amostras de sangue coletadas no tubo de EDTA foram imediatamente centrifugadas a 3.000 RPM por 10 minutos para a separação do plasma. Posteriormente as amostras de plasma foram armazenadas em microtubos de 1,5 mL e preservadas em freezer a -20°C, aguardando para serem utilizadas no processo de extração de DNA e qPCR.

4.8. Extração e purificação do DNA

O processo de extração e purificação do DNA foi realizado a partir do plasma materno. A metodologia foi automatizada em todas as etapas da extração, utilizando o equipamento QIAcube®, com o kit QIAamp® DNA Micro, empregando-se o protocolo “Purification of viral nucleic acids from large body-fluid samples”, conforme recomendações do fabricante.

4.9. Amplificação (qPCR)

Todo o procedimento prático da metodologia qPCR deste estudo foi realizado no laboratório da empresa Qiagen localizada em São Paulo-SP. A empresa Qiagen forneceu os reagentes tanto para a extração de DNA, quanto para a quantificação das amostras. Após a extração e purificação do DNA, as amostras foram preparadas para a etapa seguinte, ou seja, quantificação do material genético para identificação do sexo fetal.

A técnica foi separada em três passos: o primeiro foi o preparo da curva padrão conforme recomendações do manual *Investigator® Quantiplex HYres*, kit utilizado para os testes de quantificação. O segundo passo foi o preparo da reação de 20µL, contendo: 9uL de *Reaction Mix* + 9uL de *Primers Mix* + 2 uL de DNA alvo (volumes). O terceiro e último passo foi à amplificação genômica, utilizando a seguinte termociclagem: 1 ciclo a 95°C por 1 minuto para desnaturação inicial, seguida de 40 ciclos a 95°C por 5 segundos. A temperatura de anelamento foi de 60°C por 30 segundos, e 72°C por 20 segundos para extensão.

4.10. Estimativa da Sensibilidade (S), Especificidade (E) e Acurácia (A)

Para a estimativa da Sensibilidade (S) e Especificidade (E) do teste de qPCR foram utilizados o protocolo para testes com resultados dicotômicos, isto é, resultados expressos em duas categorias: *correto* ou *incorreto*. Assim, na avaliação de um teste diagnóstico existem 4 interpretações possíveis para o resultado do teste: 2 em que o teste está *correto* e 2 em que está *incorreto* (BEAGLEHOLE et. al. 1993).

Segundo Pereira (1995), quando o teste apresenta resultado *correto*, ele deve ser *verdadeiro positivo* (VP) ou *verdadeiro negativo* (VN), onde ambos apresentam concordância entre o resultado do teste molecular para a sexagem fetal com sexo correto da criança. Por outro lado, o teste está *incorreto* quando ele for *falso positivo* (FP) ou *falso negativo* (FN), onde ambos apresentam discordância entre o resultado do teste molecular para a sexagem fetal com sexo correto da criança. Dessa forma, na Figura 5, temos a seguinte formulação.

Figura 5. Formulação para a avaliação da Sensibilidade (S), Especificidade (E) e Acurácia (A) para os testes de diagnóstico.

Verdadeiro Positivo (VP)	Falso Positivo (FP)	a + b
[a]	[b]	N(a + b + c + d)
Falso Negativo (FN)	Verdadeiro Negativo (VN)	
[c]	[d]	
a + c	b + d	

Fonte: PEREIRA, 1995.

Dessa forma, a Sensibilidade (S) pode ser definida como a capacidade que o teste molecular apresenta de detectar os indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, de determinar o sexo corretamente dos indivíduos, enquanto que a Especificidade (E) é a capacidade que o teste molecular tem de detectar os verdadeiros negativos, isto é, de determinar o sexo corretamente dos indivíduos avaliados (FLETCHER et. al. 1983).

Onde, utilizando-se dos dados apresentados anteriormente:

Sensibilidade do teste (S)

$$S = a/(a+c)$$

Especificidade do teste (E)

$$E = d/(b+d)$$

Para a avaliação das acurácias do teste molecular para a determinação do sexo precoce utilizando DNA fetal livre circulante no plasma materno, onde a acurácia corresponde a avaliação da exatidão e/ou precisão do resultado apresentado pelo procedimento de determinação do sexo, temos:

Acurácia do teste (A)

$$A = (a + d)/N$$

4.11 Análises Estatísticas

Os dados foram registrados em planilha eletrônica Microsoft *Excel*. Criou-se um banco único, analisado com aplicação do programa IBM *Statistical Package for Social Science* (SPSS), versão 23.0. As variáveis quantitativas foram apresentadas por meio de estatísticas descritivas: média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo; e as variáveis qualitativas foram apresentadas por meio de frequência absoluta (n) e relativa (%).

A fim de verificar o grau de concordância entre o sexo da criança por USG e o resultado da qPCR foi realizado o índice de concordância Kappa.

A normalidade dos dados contínuos foi testada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. A correlação de Spearman foi utilizada para verificar a relação entre as variáveis contínuas.

A comparação dos valores médios das variáveis contínuas entre o sexo da criança por USG e o resultado da qPCR foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney. Para todas análises foi adotado um nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

5 – RESULTADOS

As estatísticas descritivas apresentadas na Tabela 1 refletem o resultado da análise dos dados demográficos, evidenciando que a idade das gestantes (IG) variou de 19 a 40 anos, com média de 27,4 anos. A idade gestacional informada (IGI) foi de 6 a 20 semanas, com média de 12,7 semanas. Adicionalmente, a Tabela 1 indica os valores obtidos para as variáveis controle interno da reação, DNA humano, DNA masculino e os resultados da determinação do sexo por USG e qPCR.

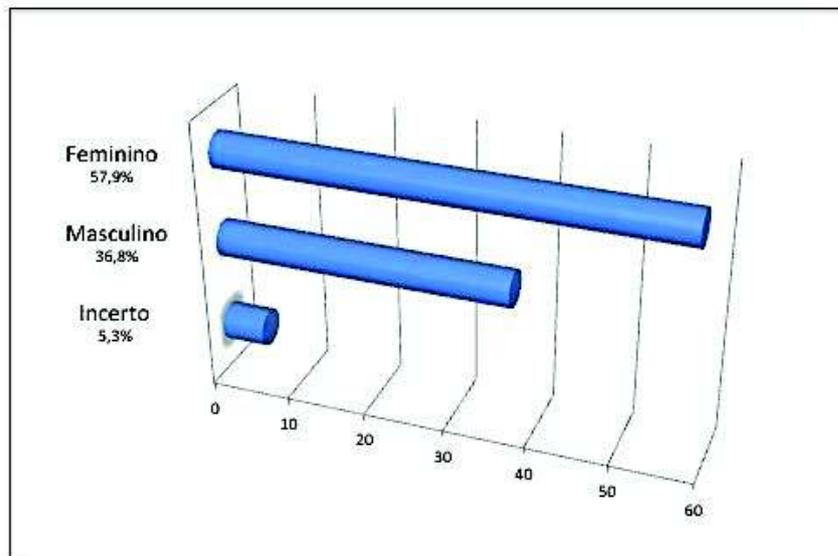
Tabela 1. Estatísticas descritivas dos resultados da análise dos dados demográficos.

Variáveis	Mediana	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Idade das Gestantes	25,0	27,4 ± 7,1	19,0	40,0
Idade Gestacional Informada	12,0	12,7 ± 4,1	6,0	20,0
CT Controle Interno da Reação	27,9	28,0 ± 0,2	27,7	28,9
CT DNA humano	29,5	29,4 ± 0,9	27,4	30,9
CT DNA Masculino	34,8	33,8 ± 2,8	30,1	37,5
		n		%
Sexo da criança (USG)				
Feminino		11		57,9
Masculino		8		42,1
Resultado qPCR				
Feminino		12*		63,2*
Masculino		7**		36,8**

(*) Nestes valores está incluso um resultado referente ao sexo masculino confirmado pela USG, sendo considerado como incerto (discordância). (**) Nestes valores está faltando um resultado referente ao sexo masculino confirmado pela USG, sendo considerado como incerto (discordância).

Das 21 amostras de sangue coletadas em gestantes com idade gestacional entre a 6^a e a 20^a semanas, 02 pacientes foram excluídas do estudo, pois apresentaram aborto espontâneo. Das 19 pacientes restantes, 7 (36,8%), foram quantificadas por qPCR com marcadores moleculares específicos para detecção do sexo masculino, 11 (57,9%) amostras negativas para o sexo masculino gerando assim resultados confiáveis para detecção do sexo feminino, apenas uma amostra (5,3%) apresentou resultado incerto, diferente do achado da USG para o sexo da criança (Figura 6).

Figura 6. Porcentagem dos resultados de sexagem fetal no plasma materno por qPCR. O resultado incerto refere-se à discordância da qPCR com o resultado da USG.



Como foi detectado uma divergência entre o resultado da qPCR e o resultado da USG quanto o sexo da criança, foi realizado o teste de concordância (Kappa), apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Resultado da análise de concordância do resultado da qPCR com o sexo da criança confirmado pela USG.

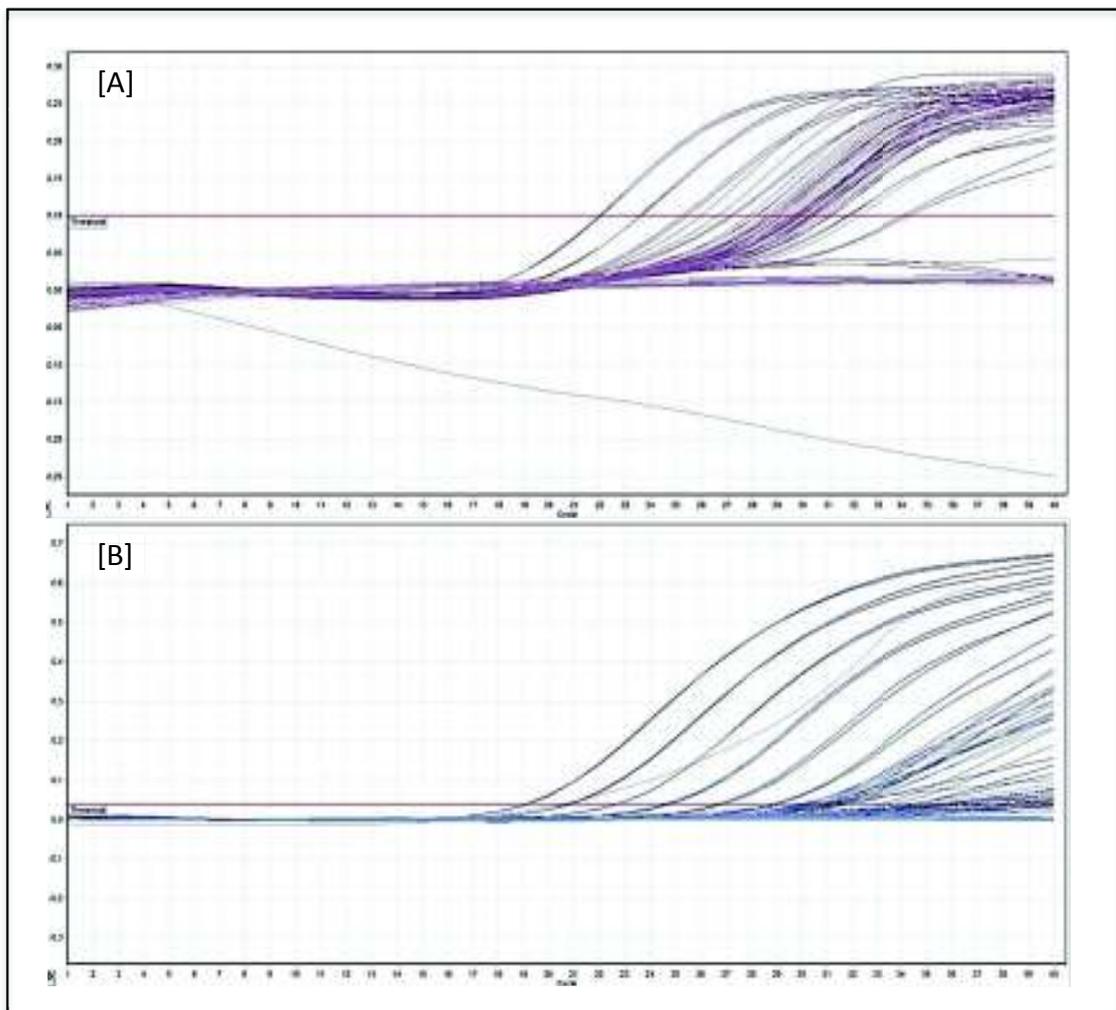
	Sexo da criança - n (%)		Total	k	p*
	Feminino	Masculino			
Resultado PCR					
Feminino	11 (100,0)	1 (12,5)	12		
Masculino	0 (0,0)	7 (87,5)	7	0,89	<0,001
Total	11	8			

*Estatística significativa de concordância *Kappa*.

A Figura 7 indica os resultados das representações gráficas da PCR quantitativa em tempo real para a determinação do sexo pré-natal com kit comercial que permite uma PCR

rápida, produzindo resultados em 51 minutos utilizando o termociclador *Rotor-Gene Q*[®] da QIAGEN – SP.

Figura 7. Resultados da qPCR na Determinação Pré-Natal do Sexo pela Análise de DNA Fetal Livre em Plasma Materno. Em [A] representação gráfica das ampliações obtidas utilizando PCR quantitativa em tempo real para quantificação de DNA humano em região autônoma de múltiplas cópias com 146pb do genoma humano – Controle da Reação. Em [B] representação gráfica da qPCR para quantificação da região DYS14 (marcador de múltiplas cópias com 129pb do gene *TSPY* – codifica proteína testículo-específica localizado no cromossomo Y). Cada reação particular é dependente de uma quantidade alvo específica de DNA marcada por fluorescência separadamente – VERD em [A] e VERM em [B].



A Tabela 3 apresenta os dados referentes à matriz de correlação de Spearman destinada a uma análise simultânea da associação entre as diversas variáveis contínuas e/ou discretas.

Tabela 3. Matriz de correlação de Spearman para análise de associação entre variáveis.

	IM	IGI	CIR	DNA Humano
IGI	-0,36			
CIR	-0,36	0,20		
DNA Humano	-0,13	0,10	0,22	
DNA Masculino	0,21	-0,02	0,23	0,12

Legenda: IGI – Idade Gestacional Informada; IM – Idade Materna; CIR – Controle Interno da Reação.

A Tabela 4 apresenta os resultados do testes de Mann-Whitney destinado à comparação da idade materna com as variáveis idade gestacional informada, controle interno da reação e as quantidades de DNA humano e DNA masculino.

Tabela 4. Resultado da comparação (Teste de Mann-Whitney) da idade materna e demais variáveis com o resultado da qPCR e o sexo da criança determinado pela USG.

	IM	IGI	CIR	DNA humano	DNA Masculino
Resultado qPCR	$p = 0,18$	$p = 0,88$	$p = 0,48$	$p = 0,43$	$p < 0,001^*$
Feminino	$29,2 \pm 7,2$	$12,6 \pm 4,8$	$28,1 \pm 0,3$	$29,62 \pm 0,9$	$35,6 \pm 1,6$
Masculino	$24,0 \pm 6,0$	$12,8 \pm 2,7$	$27,9 \pm 0,1$	$29,10 \pm 1,1$	$30,7 \pm 0,4$
Sexo da criança por USG	$p = 0,12$	$p = 0,36$	$p = 0,99$	$p = 0,84$	$p < 0,001^*$
Feminino	$29,7 \pm 7,2$	$11,9 \pm 4,3$	$27,9 \pm 0,1$	$29,5 \pm 0,9$	$35,9 \pm 0,9$
Masculino	$23,9 \pm 5,4$	$13,9 \pm 3,7$	$28,1 \pm 0,4$	$29,3 \pm 1,1$	$30,7 \pm 0,5$

Legenda: USG – Ultrassonografia; IGI – Idade Gestacional Informada; IM – Idade Materna; CIR – Controle Interno da Reação. (*) valores estatisticamente significativos.

Os resultados das estimativas da Sensibilidade (S), Especificidade (E) e Acurácia (A) dos testes de qPCR para a detecção precoce do sexo em DNA fetal livre e circulante no plasma materno estão apresentados na Tabela 5, onde foram considerados, separadamente por sexo, cada estimativa.

Tabela 5. Valores estimados para a Sensibilidade (S), Especificidade (E) e Acurácia (A) dos testes de determinação do sexo em DNA fetal livre presente no plasma materno utilizando a metodologia qPCR.

Sexo	n (qPCR/USG)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Acurácia (%)
Masculino	7/8	87,5	100,0	94,7
Feminino	12/11	100,0	87,5	94,7
Total	19/19	n/a	n/a	n/a

Legenda: n – Tamanho do grupo amostral; qPCR – Metodologia de diagnóstico por PCR Real Time Quantitativa; USG – Ultrassonografia; n/a – Não se aplica.

6 – DISCUSSÃO

Segundo Lo e colaboradores (1997) a descoberta do DNA fetal livre na circulação sanguínea materna abriu um novo horizonte de pesquisas na busca do diagnóstico pré-natal não invasivo. Esta descoberta trouxe a oportunidade em apresentar várias pesquisas demonstrando a sensibilidade e especificidade do método na determinação do sexo precoce utilizando o plasma materno. O DNA fetal livre circulante é uma ferramenta valiosa para o diagnóstico pré-natal não invasivo, porém o seu uso ainda não está sendo muito utilizado na prática obstétrica.

Em nosso estudo realizado com o uso da tecnologia de qPCR utilizando um Kit comercial (QIAGEN) permitiu obter com sucesso o DNA fetal e a determinação precoce do sexo fetal, como rotina durante o pré-natal, em gestantes com idade gestacional informada (IGI) variando de 6-20 semanas, corroborando assim, com os estudos realizados e validados por Lo & colaboradores (1989), Costa & colaboradores (2002), Sesarini & colaboradores (2009) e Tounta (2011). Dessa forma, o teste também apresenta um fator limitante para a aplicação da metodologia em outros diagnósticos, a concentração total de DNA presente no plasma das gestantes, devido a maior parte do DNA ser proveniente do próprio organismo materno (LO, 1998 & FERNANDO, 2010). Portanto, ainda existem desafios técnicos a serem ultrapassados antes da viabilização desta opção como diagnóstico pré-natal na rotina. Além disso, segundo Zhong (2001) e Hahn (2001), a quantidade de DNA circulante varia consideravelmente em indivíduos normais e saudáveis, constituindo assim, um fator que necessita de cautela na utilização desta metodologia.

Na gestação, a placenta serve como intermediadora na passagem de células fetais na circulação materna, que somado ao processo de apoptose das células trofoblásticas dá origem ao DNA fetal livre (LITTON, 2009; TOUNTA, 2011). A placenta é o órgão responsável pelo controle da liberação do material genético fetal no sangue materno. Portanto, a integridade e o bom funcionamento da placenta é fundamental na interferência nas concentrações de DNA fetal livre. Assim, qualquer doença clínica e/ou obstétrica materna que evolua com alteração vascular placentária, tais como hipertensão arterial crônica, doença hipertensiva específica da gestação e *diabetes mellitus*, podem alterar quantitativamente a detecção de DNA fetal livre no plasma materno (LO, 2000b & WATAGANARA, 2005). Atentando a essas informações e como prevenção de *viés* nos resultados desta pesquisa, foram selecionadas gestantes sem

alteração clínica e/ou obstétricas. Dessa forma, em nosso estudo foram consideradas apenas mulheres grávidas saudáveis, sem qualquer manifestação clínica de doença.

Apesar da concentração de DNA fetal livre ser menor no primeiro trimestre de gestação (AGNIESZKA, 2007), das 21 gestantes testadas, 16 estavam grávidas com até 14 semanas de gestação e 5 gestantes estavam com o tempo de gestação entre 16 a 20 semanas de gestação. Nestes períodos de gestação é importante a determinação precoce do sexo fetal, durante o período pré-natal, para o planejamento do pré-natal, para os cuidados a serem tomados no momento parto e nos cuidados pós-natais com o recém-nascido. Assim percebe-se que a sexagem fetal precoce se torna importante, pois pode contribuir de forma decisiva no monitoramento de pacientes portadores de patologias que podem ser precocemente tratadas, reduzindo também, a realização de exames invasivos (coleta de vilosidade coriônica ou de amostras do líquido amniótico).

O estudo de determinação do sexo utilizando o DNA fetal livre e circulante no plasma materno demonstra importância na detecção de ambiguidade genital. Esta evidência corrobora com o estudo realizado por Donabela (2008) o qual descreve sobre a identificação precoce da Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC), fortalecendo assim o emprego desta metodologia e a sua importância na sexagem fetal durante a gestação, e o direcionamento antecipado no esquema terapêutico e/ou profilático, que poderá ser iniciado precocemente, prevenindo a virilização dos fetos femininos afetados.

Entretanto, muitas variantes atuam na concentração total de DNA livre e, conseqüentemente, na concentração relativa do DNA fetal no sangue materno (ANGERT, 2003). Outros estudos feitos por Barrett (2011) também constaram que a concentração total de DNA livre no sangue materno, colhido em tubo EDTA, permanece estável em temperatura ambiente por até 4 horas após a coleta do material. Em condições entre 6 a 24 horas após a flebotomia, há um aumento de DNA materno na amostra. Entre 24 e 72 horas após a coleta ocasiona a diminuição significativa na proporção de DNA fetal/DNA materno. Estes estudos demonstram a degradação de células maternas após a coleta do sangue materno por apoptose, lise celular e posterior liberação do DNA materno, na amostra, dificultando a detecção do DNA fetal no material genético. Atentando a essas variantes, o processamento do material (separação do plasma), foi iniciado precocemente, em menos do que 4 horas após a coleta e congelado a -20°C , garantindo assim a manutenção da relação DNA fetal/DNA materno inicial.

O protocolo de processamento de material também é uma importante variável na taxa de detecção do DNA fetal livre em plasma materno. O método de qPCR, o tipo de reagente empregado, o fabricante dos instrumentos utilizados na extração de DNA, além do marcador padronizado para identificação do DNA fetal (JOHNSON, 2004). Atentando a essas referências os fatores de qualidade no processamento e metodologia foram empregados de forma rigorosa para não haver *viés* que poderiam comprometer os resultados deste estudo.

Atualmente, os centros de diagnósticos genéticos tendem a ser regionalizados e distantes do local onde foram realizadas as coletas. Na prática clínica, sabe-se que uma amostra de sangue colhida em uma localidade distante, podendo ter um tempo de transporte demorado até o local onde serão realizados o processamento do material (BARRETT, 2011). Portanto, neste tipo de estudo situações em que se sabe que o material levará mais do que 8 horas para iniciar o processamento. Para esse tipo de estudo seria importante que o material biológico coletado fosse armazenado em tubo que minimize o contato do material biológico fetal com o material biológico materno, a fim de melhorar a taxa de detecção do DNA fetal (BARRETT, 2011). Apesar do seu alto custo o *tubo PPT*, continua sendo uma alternativa confiável para o método de enriquecimento de DNA fetal (CAROLINA, 2013).

A técnica de qPCR é muito sensível, pois ela permite que uma única molécula de DNA de interesse (início da reação) seja copiada no final da reação, milhões de vezes. Para trazer maior confiabilidade á sexagem fetal sugerimos que os testes sejam realizados por mulheres, desde a extração do DNA até a sua amplificação. Além disso, é importante que sejam realizadas duas extrações e amplificações em diferentes datas (GARCIA, 2012). Para minimizar os problemas de contaminação o processamento das amostras foram realizados por indivíduos do sexo feminino e equipamentos robotizados.

A técnica escolhida para este estudo (qPCR) foi minuciosamente pesquisada para se ter uma confiabilidade na análise pois ela permite uma grande sensibilidade em detectar com precisão pequenas quantidades de DNA fetal presente no plasma materno. Conforme Lo e colaboradores (1998) a evolução da gravidez aumenta a quantidade de DNA fetal no plasma materno que provém de diferentes tipos de células fetais. Por não ser possível separar o DNA fetal do DNA materno igualmente presente no plasma, mas em maiores quantidades, o diagnóstico do genótipo fetal só é possível quando este apresentar sequência de bases diferentes do materno. Devido a isso a técnica escolhida para esse tipo de estudo deve apresentar uma confiabilidade extrema para não gerar resultados incertos.

Seguindo as recomendações descritas na literatura o *kit Investigator® Quantiplex HYres* foi selecionado para ser utilizado nesta pesquisa, pois o mesmo já possui uma validação e um índice de confiabilidade adequado para esta pesquisa. Pois segundo relatos encontrados na literatura, trata-se de uma técnica sujeita a variações, parte destas derivadas dos métodos de coleta e preparo do DNA (CHIU, 2001), assim a escolha dos *primers* de PCR, da metodologia de PCR propriamente dita e da idade gestacional é de extrema importância para que se tenha uma eficácia e confiabilidade nos resultados gerados (JHONSON, 2004).

Na maioria das publicações pesquisadas foram encontrados resultados falso-negativos variando entre 2 a 5% (SEZIKAWA, 2001; RIJNDERS, 2003; MARTINHAGO, 2007; ALBERRY, 2007 & BOON, 2007).

Foi pesquisada por Alberty e colaboradores (2007) a região Y específica *DYS-14* em 15 gestantes de 11 semanas através do método da PCR em tempo real e obtiveram 100% de sensibilidade e especificidade. Pesquisa que demonstrou um alto grau de confiabilidade nos testes realizados em gestantes com maior tempo de gestação.

Outro estudo também realizado em gestantes com $11,2 \pm 3,3$ semanas por Boon e colaboradores (2007) utilizando o gene *SRY* para sexagem fetal em 58 casos, utilizando a qPCR obtiveram 18 resultados positivos e 25 negativos para a presença do gene *SRY* gerando 100% de sensibilidade e 97,7% de especificidade.

Também foram avaliadas por Martinhago e colaboradores (2007), 52 gestantes a partir da 5ª semana de gestação com 92,6% de acerto em relação ao sexo fetal, utilizando como marcador o *DYS-14*. Em nosso estudo, foram obtidos 18/19 (94,7%) de acertos e 1/19 (5,3%) de discordância quando se compara a determinação do sexo por qPCR e USG. Estes valores estão de acordo com a literatura.

Adicionalmente, a validade de um teste refere-se à quanto, em termos quantitativos ou qualitativos, um teste é útil para diagnosticar um evento ou para predizê-lo. Para determinar a validade, compara-se os resultados do teste com os de um padrão, sendo que esse padrão pode ser o verdadeiro estado do paciente, se a informação está disponível, um conjunto de exames julgados mais adequados, ou uma outra forma de diagnóstico que sirva de referência. O teste diagnóstico ideal deveria fornecer, sempre, a resposta correta, ou seja, um resultado verdadeiramente positivo e um resultado verdadeiramente negativo. Além do que, deveria ser um teste rápido de ser executado, seguro, simples, inócuo, confiável e de baixo custo.

O teste ideal, com 100% de sensibilidade e especificidade raramente existe na prática, pois a tentativa de melhorar a sensibilidade freqüentemente tem o efeito de diminuir a

especificidade. Em algumas situações clínicas os resultados são obtidos através de variáveis contínuas, não havendo uma separação clara e inquestionável entre o que é "*normal*" e "*anormal*". Nas condições avaliadas neste estudo, os resultados foram considerados distintos, sendo sexo masculino e sexo feminino, separadamente. Contudo, a sensibilidade e especificidade para qPCR predizer o sexo masculino foi 87,5% e 100%, respectivamente, enquanto que para o sexo feminino foi 100% e 87,5%. Estes resultados estão próximos dos poucos dados apresentados na literatura.

Em relação a acurácia, não conseguimos identificar nenhuma literatura que apresentasse os dados de acurácia para qPCR em sexagem fetal. Contudo, nossos estudos mostram uma acurácia igual (94,5%) para a detecção do sexo masculino e do sexo feminino por qPCR.

Estes achados podem ser explicados pela natureza biológica da amostra obtida para o teste. Durante a gestação, o tecido fetal que fica em contato direto com a circulação sanguínea materna conectando o feto ao organismo materno, permitindo que células fetais que ficam em contato direto com o sangue materno (LO, 2000). Assim, a liberação de DNA fetal no plasma materno ocorre devido a esse contínuo escape de células fetais pela placenta, que são rapidamente destruídas pelo sistema imune materno, liberando o DNA fetal livre na circulação da mãe (PERTL, 2001).

A concentração do DNA fetal no plasma das gestantes aumenta gradativamente durante a gestação e são completamente eliminadas da circulação materna após o parto. A quantidade de DNA fetal masculino é proporcionalmente menor do que o DNA feminino com o decorrer do tempo gestacional, enquanto que a concentração de DNA feminino (fetal e/ou materna) aumentam proporcionalmente (AVENT, 2009; LO, 1999 & RIJNDERS, 2003). Dessa forma, a determinação do sexo masculino podem ocasionar situações de falsos negativos mais comumente do que para a determinação do sexo feminino, reduzindo assim a sensibilidade do teste para meninos (87,5%), quando comparados com a determinação do sexo para as meninas (100%). De forma inversa ocorre com a especificidade. Do ponto de vista da acurácia (94,7%) do teste, o sexo fetal não influencia, visto que os padrões técnicos da abordagem diagnóstica não se alteram.

A determinação do sexo pela análise de DNA fetal livre em plasma materno a partir da 6ª semana de gestação pela técnica de qPCR, apresentou 87,5% de sensibilidade, 100% de especificidade e acurácia de 94,7% para o sexo masculino e 100% de sensibilidade, 87,5% de especificidade e acurácia de 94,7% para o sexo feminino.

O índice de concordância encontrado 0,89 (89%) entre os resultados dos testes moleculares com a ultrassonografia permite concluir que, os testes possuem uma excelente concordância, visto que o índice ideal é acima de 0,80 (80%). Essa concordância foi significativa entre o sexo da criança confirmado pela USG e o resultado da qPCR.

Outros estudos referentes à sexagem fetal através de plasma materno devem ser conduzidos a fim de contribuir para uma melhor compreensão deste processo. A determinação não invasiva do sexo fetal está sendo, cada vez mais, melhor estabelecida e tem sido utilizada clinicamente há mais de 10 anos em diversos países da Europa. No Brasil, a sua utilização tem sido restrita, devido o seu alto custo, não estando disponível para a população de menor poder aquisitivo. Considerando a sua implantação no SUS (Sistema Único de Saúde), seria uma ótima alternativa em substituição dos procedimentos invasivos.

7 - CONCLUSÃO

O presente estudo mostra que o diagnóstico genético pré-natal não invasivo utilizando a análise de DNA fetal livre circulante no plasma materno em qPCR é viável, sendo que sensibilidade da sexagem fetal utilizando o kit comercial da QUIAGEN e equipamentos robotizados mostraram eficazes.

O equipamento *QIAcube*®, o kit *QIAamp*® *DNA Micro*, empregando-se o protocolo “*Purification of viral nucleic acids from large body-fluid samples*”, se mostrou eficiente no processo de extração do DNA. O tempo de extração foi relativamente baixo, a quantidade e qualidade do DNA foram consideradas satisfatórias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfirevic, Z.; Mujezinovic, F.; Sundberg, K. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis (Review). 2009.
- Angert, R.M. et al. Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: analysis of first-and third-trimester samples. *Clinical chemistry*. 2003;49(1):195-8.
- Avent, N.D. et al. Cell-free fetal DNA in the maternal serum and plasma: current and evolving applications. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2009;21(2):175-9.
- Avni, F. et al. Evolution of fetal ultrasonography. *European radiology*. 2007;17(2):419-31.
- Beaglehole, R.; Bonita, R. & Kjellstrom, T. *Basic Epidemiology*. World Health Organization, Geneva, 1993.
- Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol*. 1999;105:574–583.
- Bianchi, D. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential—a review. *Placenta*. 2004;25:S93-S101.
- Bianchi, D.W. et al. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(2):705-8.
- Bianchi, D.W. et al. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *The American Journal of Human Genetics*. 1997;61(4):822-9.
- Bischoff, F.Z. et al. Cell-free fetal DNA and intact fetal cells in maternal blood circulation: implications for first and second trimester non-invasive prenatal diagnosis. *Human reproduction update*. 2002;8(6):493-500.
- Bischoff, F.Z.; Lewis, D.E.; Simpson, J.L. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Human reproduction update*. 2005;11(1):59-67.
- Castaño, V.T.; Álvarez, J.F.C.; Estrada, J.G.M.; Nuevas perspectivas en diagnóstico

prenatal. *Medicina & Laboratório*. 2010;16:561-570.

- Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2004;50:88-92.
- Chiu, R.W. et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ: British Medical Journal*. 2011;342.
- Chiu, R.W.; Lo, Y. Noninvasive prenatal diagnosis empowered by high-throughput sequencing. *Prenatal diagnosis*. 2012; 32(4):401-6.
- Choi TY, Lee HM, Park WK, Jeong SY, Moon HS. Spontaneous abortion and recurrent miscarriage: A comparison of cytogenetic diagnosis in 250 cases. *Obstet Gynecol Sci*. 2014;57(6):518-525.
- Costa J-M, Benachi A, Gautier E. New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *New England Journal of Medicine*. 2002;346(19):1502-.
- Daniels, G. et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *Prenatal diagnosis*. 2009;29(2):101-7.
- Dhallan, R. Au W-C, Mattagajasingh S, Emche S, Bayliss P, Damewood M, et al. Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 2004;291(9):1114-9.
- Ding, C. et al. MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(29):10762-7.
- Eisenberg, B.; Wapner, R.J. Clinical procedures in prenatal diagnosis. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2002;16(5):611-27.
- Evans MI, Wapner RJ, editors. *Invasive prenatal diagnostic procedures 2005. Seminars in perinatology*; 2005: Elsevier.
- Faas, B.H. et al. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidies using massively parallel sequencing-by-ligation and evidence that cell-free fetal DNA in the maternal plasma originates from cytotrophoblastic cells. *Expert Opinion on Biological Therapy*.

2012;12(S1):S19-S26.

- Fan, H.C. et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(42):16266-71.
- Fletcher, R.M.; Fletcher, S.W. & Wagner, E.H. *Clinical Epidemiology, the essentials*. Baltimore - USA, Ed. Wawerly, 1983.
- Flori, E. et al. Circulating cell- free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytio- trophoblastic cells. Case report. *Human Reproduction*. 2004;19(3):723-4.
- Heid, C.A. et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996; 6(10):986-994.
- Hernandez-Andrade, E. et al. Prenatal diagnosis in the first trimester, whom and how?]. *Ginecología y obstetricia de México*. 2002;70:607.
- Hill M, Finning K, Martin P, Hogg J, Meaney C, Norbury G et al. Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice. *Clin Genet*. 2011;80:68-75.
- Keymolen, K.; Goossens, V. Clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis: the Brussels' experience. *European Journal of Human Genetics*. 2007;15(7):752-8.
- Kutuyavin, IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, et al. 3'-minor groove binder DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(2):655-661.
- Leon, S. et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer research*. 1977;37(3):646-50.
- Leveno, K.J. et al. *Manual de Obstetrícia e Williams: Complicações na Gestação*. Artmed. 23ª edição. 2014
- Levi, J.E.; Wendel, S.; Takaoka, D.T. Determinação pré-natal do sexo fetal por meio da análise de DNA no plasma materno. *RBGO*. 2003;25(9).
- Lichtenstein, A.V et al. Circulating nucleic acids and apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;945(1):239-49.

- Lim, J.H.; Park, S.Y.; Ryu, H.M. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 21 using cell-free fetal DNA in maternal blood. *Obstetrics & Gynecology Science*. 2013;56(2):58-66.
- Litton, C. et al. Noninvasive prenatal diagnosis: past, present, and future. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*. 2009;76(6):521-8.
- Lo, Y.D. Recent advances in fetal nucleic acids in maternal plasma. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2005;53(3):293-6.
- Lo, Y. et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *the lancet*. 1997;350(9076):485-7.
- Lo, Y. et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *The American Journal of Human Genetics*. 1998;62(4):768-75.
- Lo, Y. et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *The American Journal of Human Genetics*. 1999;64(1):218-24.
- Lo, Y.D, et al. Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clinical chemistry*. 2000; 46 (9):1301-9.
- Lo, Y.D. et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *New England Journal of Medicine*. 1998;339(24):1734-8.
- Lo, Y.D. et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clinical chemistry*. 1999;45(2):184-8.
- Lo, Y.D. Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic applications. *Clinical chemistry*. 2000;46(12):1903-6.
- Lo, Y.D.; Chiu, R.W. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Nature Reviews Genetics*. 2006;8(1):71-7.
- Lo, Y.M.D. Non-invasive prenatal diagnosis by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA. *Open biology*. 2012;2 (6).
- Lo, Y.M.D.; Chiu, R.W.K. Genomic analysis of fetal nucleic acids in maternal blood. *Annual review of genomics and human genetics*. 2012;13:285-306.

- Malone, F.D. et al. First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(19):2001-11.
- Martinhago, C.D. et al. Determinação precoce do sexo fetal pela análise do DNA no plasma materno. *Rev Bras Ginecologia e Obstetrícia*. 2006(28):190-4.
- McCullough RM, Almasri EA, Guan X, Geis JA, Hicks SC, et al. Non-Invasive Prenatal Chromosomal Aneuploidy Testing - Clinical Experience: 100,000 Clinical Samples. *PLoS ONE*. 2014;9(10):e109173.
- Nascimento S, Suarez ER, Pinhal MPS. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. *RBM Rev Bras Med*. 2010;67:7-19.
- Newson AJ. Ethical aspects arising from non-invasive fetal diagnosis. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2008;13:103-108.
- Nicolaidis, K.H. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenatal diagnosis*. 2011;31(1):7-15.
- Pereira, M.G. *Epidemiologia: Teoria e Prática*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1995.
- Pertl, B.; Bianchi, D.W. Fetal DNA in maternal plasma: emerging clinical applications. *Obstetrics & Gynecology*. 2001;98(3):483-90.
- Resta, R.G. Changing demographics of advanced maternal age (AMA) and the impact on the predicted incidence of Down syndrome in the United States: implications for prenatal screening and genetic counseling. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2005;133(1):31-6.
- Rijnders, R. et al. Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma. *Prenatal diagnosis*. 2003;23(13):1042-4.
- Rodeck, C.H.; Whittle, M.J. *Fetal medicine: basic science and clinical practice*: Elsevier Health Sciences; 2009.
- Sayres, L.C, Cho, M.K. Cell-free fetal nucleic acid testing: a review of the technology and its applications. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 2011;66 (7):431-42.
- Schmorl, G. *Pathologisch-anatomische untersuchungen über puerperal-eklampsie*: Vogel; 1893.

- Sekizawa, A.; Kondo, T.; Iwasaki, M. Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.*, 47:1856-8, 2001.
- Sesarini, C.; Argibay, P.; Otaño, L.; Diagnóstico prenatal no invasivo: Ácidos nucleicos de origen fetal en sangre materna. *Medicina (Buenos Aires)*. 2010;70(6):537-42.
- Sikora A, Zimmermann BG, Rusterholz C, Birri D, Kolla V, Lapaire O, et al. Detection of increased amounts of cell-free DNA with short PCR amplicons. *Clin Chem*. 2010;56(1)136-138.
- Site. Disponível em: <<https://portefoliobiologia.wordpress.com/2015/11/09/diferentes-metodos-de-diagnostico-pre-natal/>> Acessado em: 05 de junho de 2017, às 17:18.
- Smid, M. et al. No evidence of fetal DNA persistence in maternal plasma after pregnancy. *Hum Genet*. 2003b.
- Sparks, A.B. et al. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenatal diagnosis*. 2012; 32(1):3-9.
- Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal Diagn Ther*. 2010;27:1-7.
- Tounta, G. et al. Non-invasive prenatal diagnosis using cell-free fetal nucleic acids in maternal plasma: Progress overview beyond predictive and personalized diagnosis. *The EPMA journal*. 2011;2(2):163-71.
- Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet*. 1969;1:1119-1122.
- Wright, C.F.; Burton, H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Human reproduction update*. 2009;15(1):139-51.
- Zolotukhina TV, Shilova NV, Voskoboeva EY. Analysis of cell-free fetal DNA in plasma and sérum of pregnant women. *J Histochem Cytochem*. 2005; 53(3): 297-299.
- Zolotukhina, T.V.; Shilova, N.V.; Voskoboeva, E.Y. Analysis of cell-free fetal in plasma and sérum of pregnant women. *J Histochem Cytochem*. 2005; 53(3):297-299.

9 – APÊNDICE

9.1. Questionário



QUESTIONÁRIO

Número: _____

Nome: _____

Data de nascimento: ___/___/___ Idade: _____

Documento de Identidade: _____ Org. Exp. _____

CPF: _____ Profissão: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Telefone: _____ Celular: _____

Naturalidade: _____ Nacionalidade: _____

Email: _____

Teve gestações anteriores? () sim () não

Quantos (as)? menino() menina ()

Já teve aborto? () sim () não

Quantas vezes? () 1 () 2 () 3 () Mais de 3 () Nunca

Idade gestacional atual (em semanas): _____

Realizou alguma transfusão de sangue nos últimos três meses: ()

Feto: () único () gemelar () trigemelar

Sexo do feto: () não sabe () menina () menino

Assinatura da paciente

Responsável pela coleta : Keller Gabriel Martins CRBIO 76461-04

Data da coleta:_____.

OBS:_____

_____.

9.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do Projeto de Pesquisa sob o título **Determinação pré-natal do sexo fetal pela análise do DNA no plasma materno**. Meu nome é Cláudio Carlos da Silva, sou o pesquisador responsável, doutor em Biologia Celular e Molecular. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, este documento deverá ser assinado em duas vias e em todas as páginas, sendo a primeira via de guarda e confidencialidade do Pesquisador responsável e a segunda via ficará sob sua responsabilidade para quaisquer fins. Em caso de recusa, você não será penalizado (a) de forma alguma. Em caso de dúvida **sobre a pesquisa**, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável **Cláudio Carlos da Silva**, nos telefones: (62) 3946-1385/ (62) 3946-1443, ou através do e-mail **dasilva.genetica@gmail.com**. Em caso de dúvida **sobre a ética aplicada a pesquisa**, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, telefone: (62) 3946-1512, localizado na Avenida Universitária, N° 1069, Setor Universitário, Goiânia Goiás.

I. Este projeto tem o objetivo de desenvolver um procedimento de determinação precoce do sexo fetal a partir do sangue materno. Esta pesquisa justifica-se a necessidade de rever as evidências disponíveis sobre a segurança e eficácia de novas técnicas para verificar o sexo do bebê a partir do sangue da mãe, que não prejudique a criança e a mãe. Será feito a inclusão da senhora como grupo controle, o que significa que se já possui um exame que tenha identificado o sexo do seu bebê, a senhora fará o teste apenas para confirmar o exame já realizado.

II. A sua participação na pesquisa inclui: a) responder um questionário com perguntas relacionadas a gestação; b) doação de 10 mL de amostra de sangue.

III. A coleta de sangue será realizada no Núcleo de Pesquisas Replicon da PUC-Goiás por profissionais habilitados para essa função.

- IV. o material biológico coletado será armazenado no laboratório Replicon da PUC-Goiás até o final do período da realização do projeto. Ficará sob a responsabilidade do pesquisador Cláudio Carlos da Silva e este material poderá ser retirado a qualquer momento pela senhora.
- V. O descarte do material ocorrerá segundo as normas e regulamento institucional.
- VI. Os riscos decorrentes da sua participação na pesquisa são mínimos, próprios de qualquer coleta de sangue, que são dor no local e possível aparecimento de manchas roxas (hematomas). Caso ocorra qualquer intercorrência devido à coleta de sangue (crise nervosa, com dificuldade respiratória, aumento da pressão arterial, sudorese intensa), o participante será encaminhado imediatamente ao serviço de assistência à saúde gratuita e integral para dano direto ou indireto, imediato ou tardio em decorrência da sua participação na pesquisa.
- VII. Os benefícios referentes à coleta de sangue é que este estudo traga informações importantes para o desenvolvimento de métodos de diagnósticos pré-natal não-invasivos, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa diminuir a necessidade de utilização de procedimentos invasivos.
- VIII. A senhora tem a opção de tomar conhecimento ou não do resultado do sexo fetal.
- IX. A participação no estudo não acarretará custos para você e também não haverá nenhuma remuneração financeira. Os gastos necessários para sua participação na pesquisa serão assumidos pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial (justiça comum).
- X. Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento.
- XI. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. O(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e as informações colhidas serão utilizadas somente para fins científicos.
- XII. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas a sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Todos os dados que permitam a identificação pessoal serão mantidos em sigilo profissional e científico. Sendo-lhe garantido que todos os resultados obtidos serão utilizados somente para estudos científicos e não irão prejudicar qualquer tratamento que o participante esteja sendo submetido (a).

XIII. Este termo será assinado em duas vias, sendo que uma ficará sob responsabilidade do pesquisador e a outra via será entregue ao participante da pesquisa.

Eu _____, RG _____, abaixo assinado, discuti com o **Dr. Cláudio Carlos da Silva** 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 de assistência integral e gratuita por danos diretos e indiretos, imediatos ou tardios 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.

Goiânia, _____, de _____, de 20____.

Assinatura do participante

____/____/_____
Data

Assinatura do responsável pelo estudo

____/____/_____
Data

9.3. Termo de Aceite do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETERMINAÇÃO PRÉ-NATAL DO SEXO FETAL PELA ANÁLISE DO DNA NO PLASMA MATERNO

Pesquisador: Cláudio Carlos da Silva

Área Temática: Genética Humana;

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 62563416.4.0000.0037

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC/Goiás

Patrocinador Principal: Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC/Goiás

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.017.457

Apresentação do Projeto:

O projeto intitulado: "DETERMINAÇÃO PRÉ-NATAL DO SEXO FETAL PELA ANÁLISE DO DNA NO PLASMA MATERNO", de acordo com o documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_800423.pdf", trata de um "estudo que tem como desafio validar uma técnica diagnóstica e, portanto trata-se de um estudo prospectivo de validação de teste diagnóstico. O objetivo da presente proposta é desenvolver um teste pré-natal não invasivo para a determinação precoce do sexo fetal, utilizando DNA fetal circulante em plasma materno".

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: O objetivo do presente estudo é desenvolver um teste pré-natal não invasivo para a determinação precoce do sexo fetal pela técnica de PCR em tempo real a partir do primeiro trimestre de gestação.

Objetivo Secundário:

- Avaliar a sensibilidade e especificidade do método em estudo, a partir do primeiro trimestre de gestação;- Estabelecer um método de diagnóstico pré-natal não invasivo analisando o DNA fetal por meio de PCR em tempo real;- Quantificar o DNA fetal plasmático, baseado na identificação de

Endereço: Av. Universitária, N.º 1.069

Bairro: Setor Universitário

CEP: 74.605-010

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3946-1512

Fax: (62)3946-1070

E-mail: cep@pucgoias.edu.br



Continuação do Parecer: 2.017.457

sequências Y específicas;- Entender a metodologia geral necessária para a análise de DNA fetal circulante em plasma materno;- Otimizar e implementar uma metodologia simples e precisa para determinação do sexo fetal; - Desenvolver uma metodologia para identificação do sexo fetal a partir do plasma materno;- Aprimorar e difundir a técnica tornando este ponto um fator importante no sucesso de testes genéticos não invasivos;- Verificar a especificidade e sensibilidade da sexagem fetal correlacionando com o sexo fenotípico fetal verificado pela ultrassonografia e/ou pelo exame físico do recém-nascido;- Correlacionar a sensibilidade da sexagem com a idade gestacional e com o sexo fenotípico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o documento intitulado: "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_800423.pdf", os riscos e benefícios descritos são: "Riscos: Os desconfortos e riscos minimizados são os decorrentes de uma coleta de sangue com agulha da veia do braço. A coleta de sangue pode causar um pouco de desconforto na punção e às vezes pode causar hematoma ou inchaço temporário. Benefícios: Esperamos que este estudo traga informações importantes para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico pré-natal não-invasivo, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa diminuir a necessidade de utilização de procedimentos invasivos."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não se aplica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram vinculados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Existiam cinco pendências, sendo uma do projeto e quatro referentes ao TCLE. Após revisão do pesquisador responsável, todas as pendências destacadas foram corrigidas de acordo com as especificações anteriores.

Considerações Finais a critério do CEP:

INFORMAÇÕES AO PESQUISADOR REFERENTE À APROVAÇÃO DO REFERIDO PROTOCOLO:

1. A aprovação deste, conferida pelo CEP PUC Goiás, não isenta o Pesquisador de prestar satisfação sobre sua pesquisa em casos de alterações metodológicas, principalmente no que se refere à população de estudo ou centros participantes/coparticipantes.

Endereço: Av. Universitária, N.º 1.069
Bairro: Setor Universitário CEP: 74.605-010
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3946-1512 Fax: (62)3946-1070 E-mail: cep@pucgoias.edu.br



Continuação do Parecer: 2.017.457

2. O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP PUC Goiás, via Plataforma Brasil, relatórios semestrais do andamento do protocolo aprovado, quando do encerramento, as conclusões e publicações. O não cumprimento deste poderá acarretar em suspensão do estudo.
3. O CEP PUC Goiás poderá realizar escolha aleatória de protocolo de pesquisa aprovado para verificação do cumprimento das resoluções pertinentes.
4. Cabe ao pesquisador cumprir com o preconizado pelas Resoluções pertinentes à proposta de pesquisa aprovada, garantindo seguimento fiel ao protocolo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_800423.pdf	29/03/2017 16:04:45		Aceito
Outros	doc.bmp	29/03/2017 16:02:50	Cláudio Carlos da Silva	Aceito
Outros	Pendencias.docx	23/03/2017 16:42:20	Cláudio Carlos da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	23/03/2017 16:40:31	Cláudio Carlos da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	23/03/2017 16:40:18	Cláudio Carlos da Silva	Aceito
Outros	keller.pdf	08/11/2016 18:23:54	Cláudio Carlos da Silva	Aceito
Outros	emilia.pdf	08/11/2016 18:22:45	Cláudio Carlos da Silva	Aceito
Outros	claudio.pdf	08/11/2016 18:21:39	Cláudio Carlos da Silva	Aceito
Outros	DECK.jpeg	27/09/2016 13:50:50	Cláudio Carlos da Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	27/09/2016 13:50:11	Cláudio Carlos da Silva	Aceito
Outros	Questionario.docx	27/09/2016 11:10:35	Cláudio Carlos da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Universitária, N.º 1.069
Bairro: Setor Universitário CEP: 74.605-010
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3946-1512 Fax: (62)3946-1070 E-mail: cep@pucgoias.edu.br



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE GOIÁS -
PUC/GOIÁS



Continuação do Parecer: 2.017/457

GOIANIA, 17 de Abril de 2017

Assinado por:
NELSON JORGE DA SILVA JR.
(Coordenador)

Endereço: Av. Universitária, N.º 1.069

Bairro: Setor Universitário

CEP: 74.605-010

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3946-1512

Fax: (62)3946-1070

E-mail: cep@pucgoias.edu.br