



Louise Lapagesse de Camargo Pinto

- Médica Geneticista do Hospital Infantil Joana de Gusmão
- Professora de Genética Clínica Ambulatório Materno Infantil – Unisul Tubarão
- Especialista em Genética Médica, Sociedade Brasileira de Genética Médica
- Mestre em Genética e Biologia Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

NIPT teste: Indicações e Interpretação

Dra Louise Lapagesse de Camargo Pinto

Medica Geneticista

Florianopolis 31 de maio de 2018



Epidemiologia

- 10 a 30% do óvulos fertilizados tem uma aneuploidia
- 50% dos abortos apresentam um aneuploidia
- 5-10% dos natimortos apresentam uma aneuploidia
- 0,5% dos nativos apresentam uma aneuploidia

Wolf et al, 2009

Zimmermann et al.

Page 15

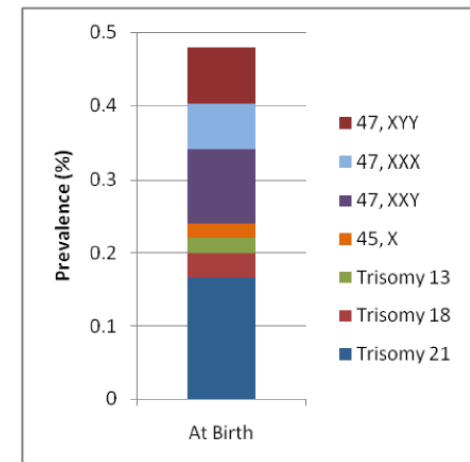


Figure 3.
At-birth prevalence of aneuploidy.

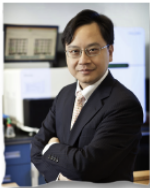
Descoberta do DNA fetal livre no plasma materno

THE LANCET

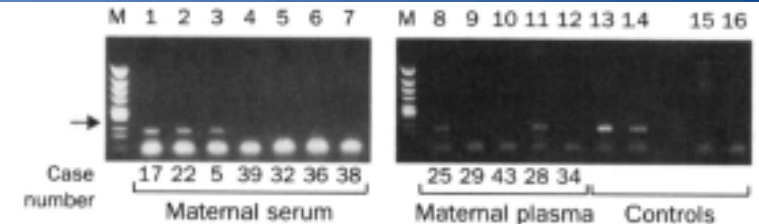
Early report

Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum

Y M Dennis Lo, Noemi Corbetta, Paul F Chamberlain, Vik Rai, Ian L Sargent, Christopher W G Redman, James S Wainscoat



Dennis Lo is the Director of the Li Ka Shing Institute of Health Sciences and the Chairman of the Department of Chemical Pathology of The Chinese University of Hong Kong. In 1997, Dennis Lo and his co-workers reported the presence of cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women. Since then, he and his co-workers have elucidated the fundamental biological characteristics regarding circulating fetal DNA as well as its clinical applications in non-invasive prenatal testing. In recognition of his work, Dennis Lo has won numerous awards, including a 2005 State Natural Science Award from the State Council of China and the Ernesto Illy Trieste Science Prize from the Academy of Sciences for the Developing World. He was elected to the Royal Society in 2011 and as a Foreign Associate of the US National Academy of Sciences in 2013.



Amplification of fetal Y-chromosomal sequences from maternal plasma and serum

Lanes 13 and 14=Y-PCR on male genomic DNA (positive controls); lane 13 DNA equivalent to ten male cells; lane 14 DNA equivalent of one male cell. Lane 15, 1 µg female genomic DNA (negative control). Lane 16, water (negative control). Arrow marks position of 198 bp Y-PCR product. M=molecular weight marker (φX174 DNA digested with *HincII*).

Tracking fetal development through molecular analysis of maternal biofluids★

Andrea G. Edlow and Diana W. Bianchi^{*}

Key Developments: Fetal Nucleic Acids in Maternal Blood

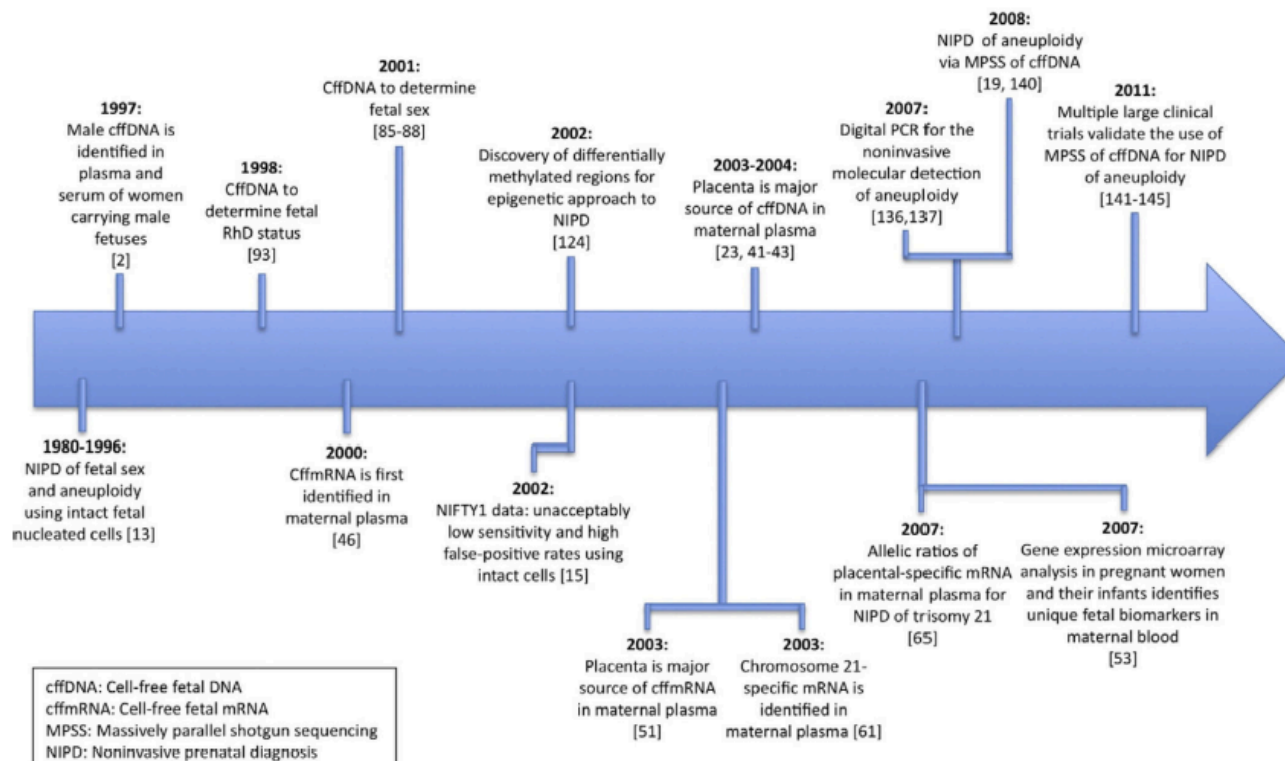
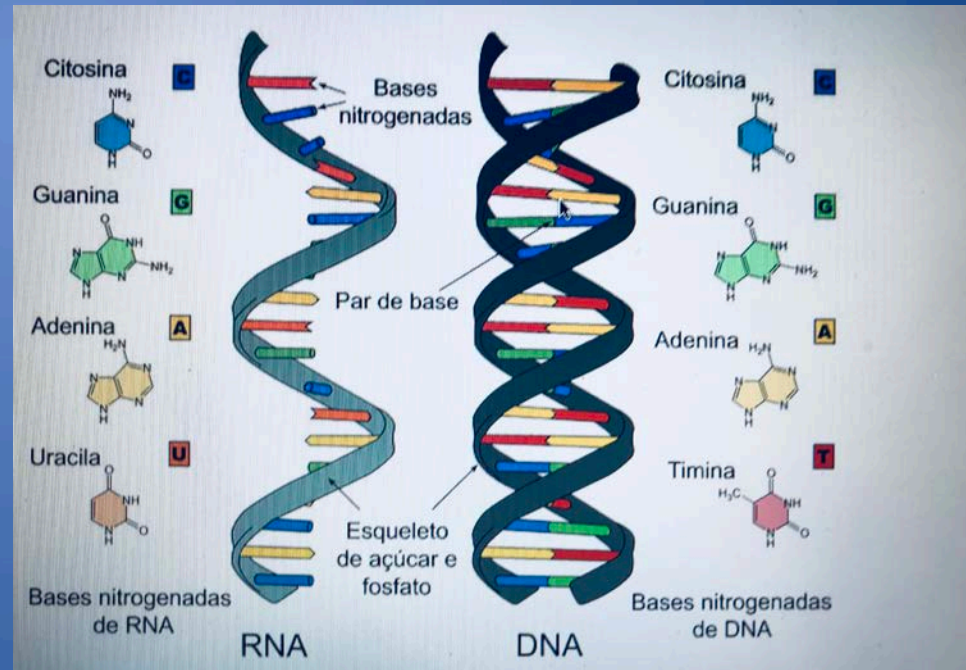


Fig. 1.

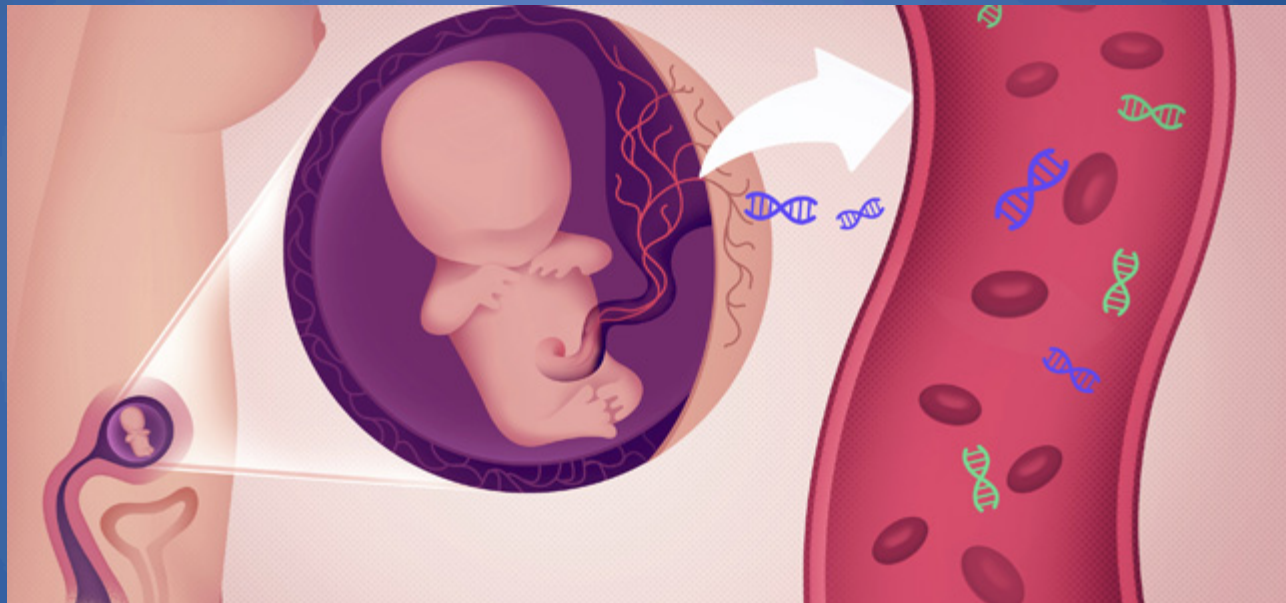
Timeline of major discoveries involving fetal nucleic acids in maternal blood.

DNA

- 30.000 genes
- 3 bilhoes de pares de base
- 10% do DNA codfica proteina
- Sequencia repetitiva
- 0,01% de diferença entre as pessoas

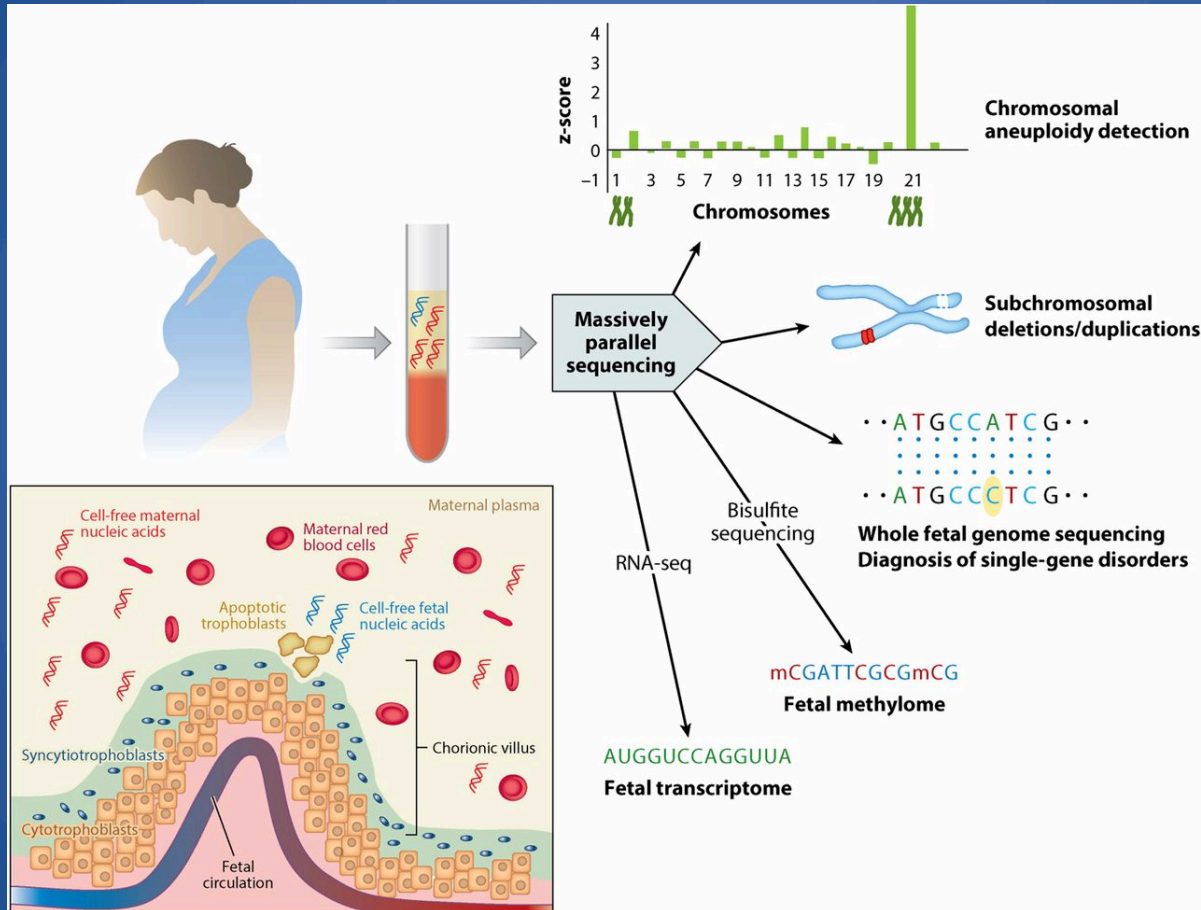


Pesquisa de DNA fetal em sangue materno



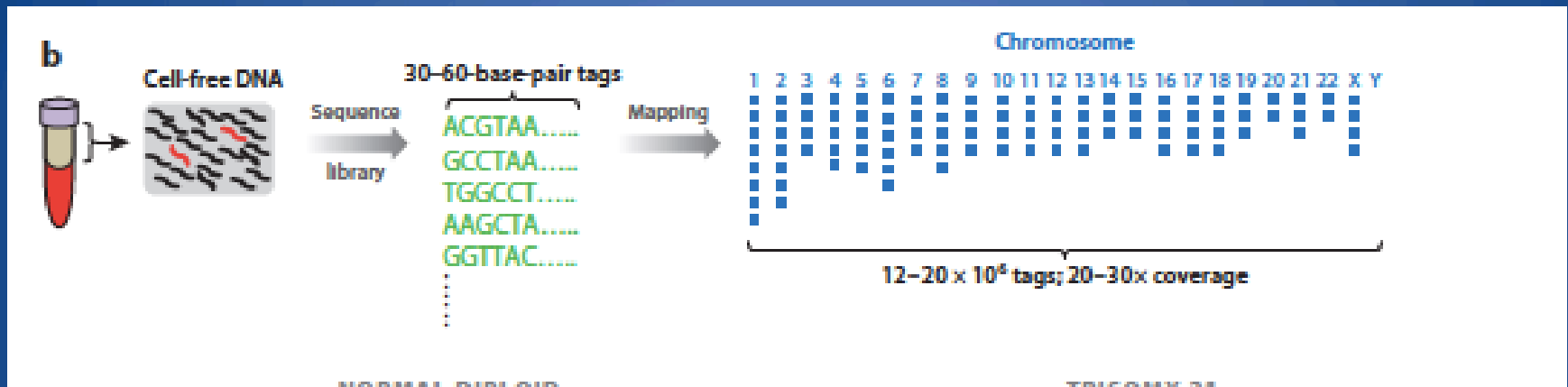
A partir da 9ª semana de idade gestacional

NIPT



Wong FCK, Lo YMD. 2016.
Annu. Rev. Med. 67:419–32

Sequenciamento Maciçamente em Paralelo (MPS)



- Fragmentos de todo genoma
- Contagem de grande numero de fragmentos
- Cada sequencia é comparada

Greig A et al, 2014 NIPT by NGS

<http://www.fcmsantacasasp.edu.br/images/Pos-graduacao/dissertacoes-e-teses/ciencias-da-saude/2015/2015-Viviane-Cristina-Mello-Andari.pdf>

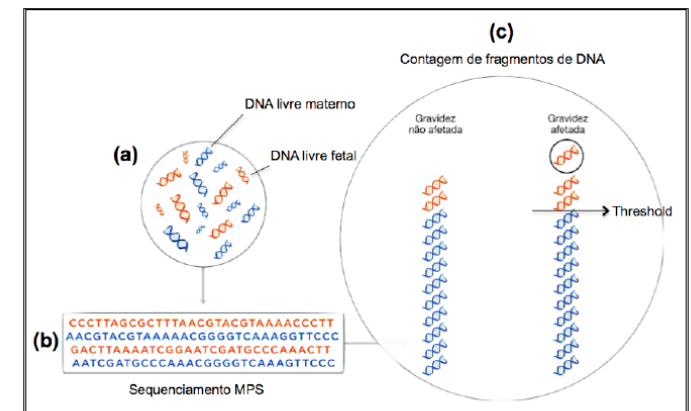
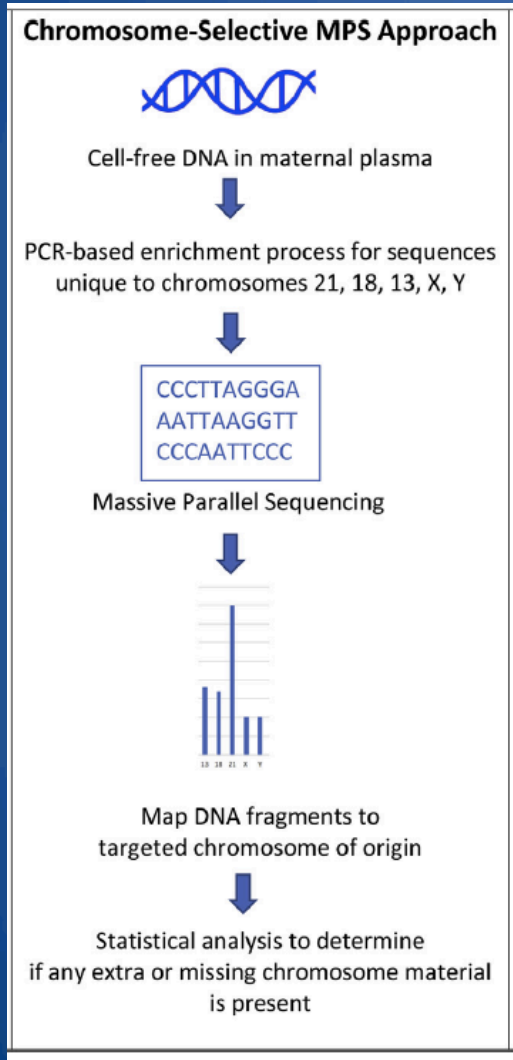


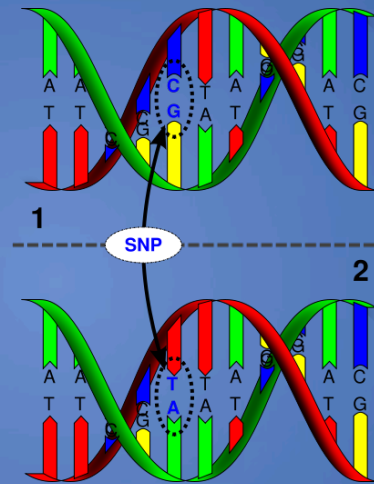
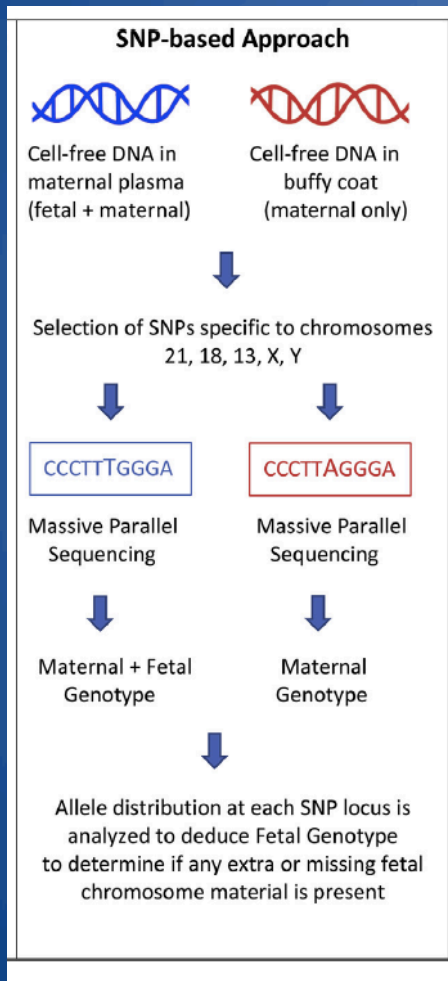
Figura 1. Esquema ilustrativo do sequenciamento por MPS. (a) No sangue da mãe existem os fragmentos de DNA livres de origem fetal e materna; (b) todos os fragmentos são sequenciados simultaneamente; (c) cada sequência é atribuída ao cromossomo que a originou e o excesso ou déficit na quantidade de fragmentos, com relação a um limiar esperado para gestações euplóide, é considerado uma aneuploidia. Adaptado do portfólio de Redwood City, CA, USA.

Sequenciamento Maciçamente Seletivo (t-MPS)



- Sequencia regiões específicas
- Menor custo
- Maior especificidade
- Excesso ou redução relativo(a) da sequencia em interesse

POLIMORFISMOS DE CADEIA ÚNICA (SNPs)



- Determina a contribuição quantitativa de DNA fetal e materno
- Única que identifica DNA circulante fetal

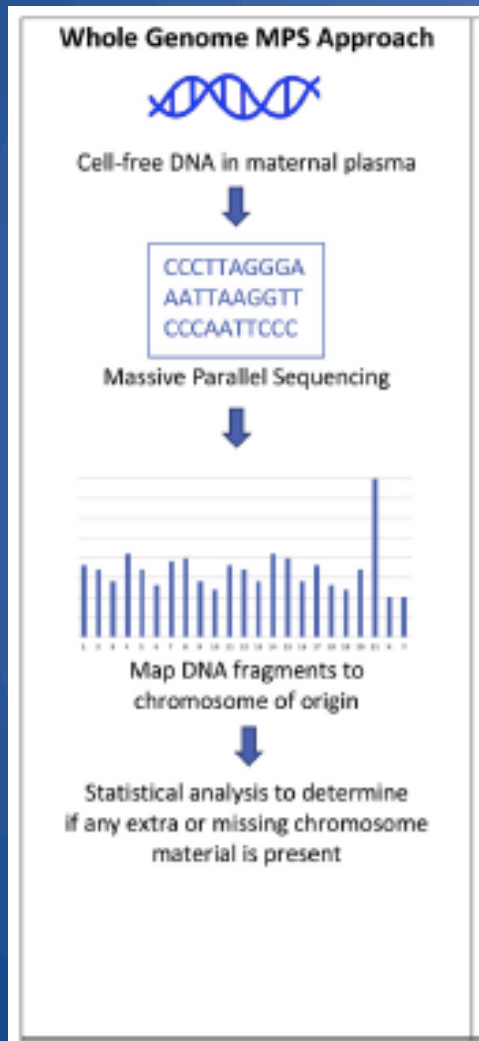
TABELA COMPARATIVA ENTRE AS TECNICAS NIPT

Tabela 4. Benefícios e limitações dos métodos aplicados aos testes genéticos pré-natais não invasivos para aneuploidias.

Métodos	s-MPS	t-MPS	SNP
Benefícios	<ul style="list-style-type: none"> - todos os cromossomos são avaliados - aneuploidias - microdeleções 	<ul style="list-style-type: none"> - mais fragmentos são avaliados por cromossomo - mais amostras são analisadas por ensaio - custo da avaliação é menor 	<ul style="list-style-type: none"> - técnica baseada no padrão de distribuição dos alelos - a partir da 9ª semana - risco individualizado - origem da alteração (consanguinidade e dissomia uniparental) -microdeleções -aneuploidias --triploidias - gêmeo desaparecido
Limitações	<ul style="list-style-type: none"> - técnica de contagem de fragmento - ajuste de bases GC - menos amostras são avaliadas por ensaio - custo da avaliação é maior 	<ul style="list-style-type: none"> - técnica de contagem de fragmentos - apenas cromossomos envolvidos nas principais síndromes são avaliados 	<ul style="list-style-type: none"> - não distingue triploidia de gêmeo desaparecido

Fontes: Chiu et al., 2008; Bianchi et al., 2012; Sparks et al., 2012b; Nicolaides et al., 2012; Zimmermann et al., 2012

Sequenciamento do Genoma Completo



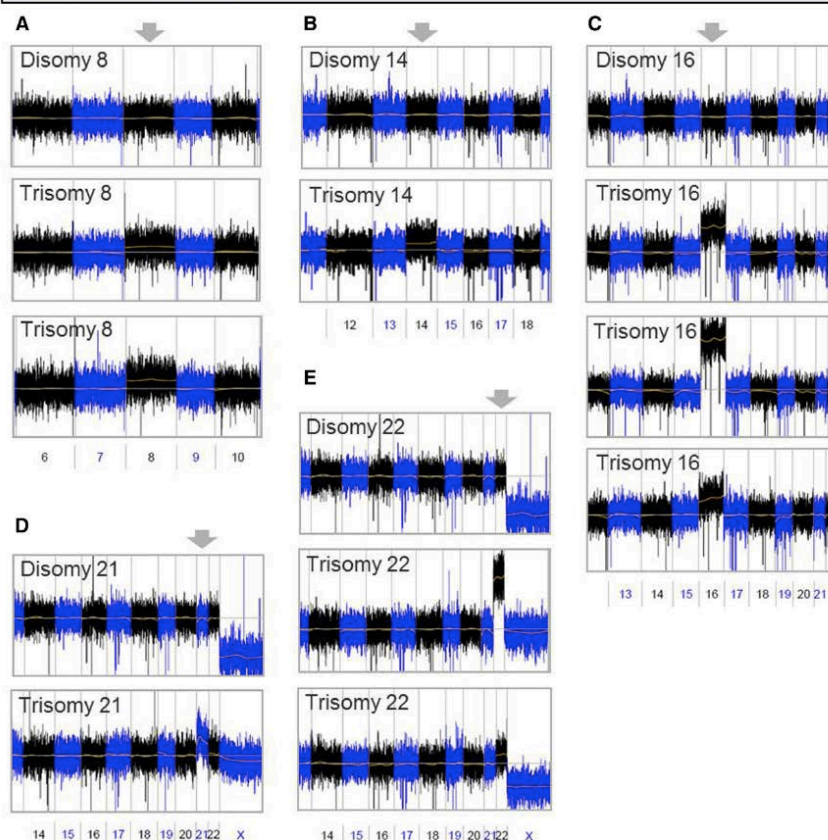
Compara DNA fetal com o materno
“Mais completo” cromossomopatias e monogenicas
Detecta 85% de mutações novas
Valor preditivo positivo de 74%
Determina herança materna em 94% do SNPs
Principalmente para doenças ligadas ao cromossomo X
Risco potencial de doenças de inicio tardio

Clinical validation of a noninvasive prenatal test for genomewide detection of fetal copy number variants



Roy B. Lefkowitz, PhD; John A. Tynan, PhD; Tong Liu, PhD; Yijin Wu, PhD; Amin R. Mazloom, PhD; Eyad Almasri, MS; Grant Hogg, MS; Vach Angkachatchai, PhD; Chen Zhao, PhD; Daniel S. Grosu, MD; Graham McLennan, MS; Mathias Ehrich, MD

SUPPLEMENTAL FIGURE 1
Analysis of disomy and trisomy





The American College of
Obstetricians and Gynecologists
WOMEN'S HEALTH CARE PHYSICIANS



Society for
Maternal-Fetal
Medicine

COMMITTEE OPINION

Number 640 • September 2015
(Reaffirmed 2017)

(This Committee Opinion Replaces Committee Opinion Number 545)

Committee on Genetics
Society for Maternal-Fetal Medicine

This document reflects emerging clinical and scientific advances as of the date issued and is subject to change. The information should not be construed as dictating an exclusive course of treatment or procedure to be followed.

Cell-free DNA Screening for Fetal Aneuploidy

Table 1. Cell-free DNA Test Performance Characteristics in Patients Who Receive an Interpretable Result* ↵

			Age 25 years	Age 40 years
	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	PPV (%)
Trisomy 21	99.3	99.8	33	87
Trisomy 18	97.4	99.8	13	68
Trisomy 13	91.6	99.9	9	57
Sex chromosome aneuploidy	91.0	99.6	—†	—

Table 2

Comparison of widely used screening tests for chromosomal disorders.

Screening test	Components	Gestational age	Detection rate	False-positive rate	Advantages	Disadvantages
First trimester NT ultrasound	NT	10–14 weeks	Tri 21: 64–70%	—	Useful in multifetal pregnancies	NT certified provider
Combined first-trimester screen	NT	10–14 weeks	Tri 21: 82–87%	5%	Results in 1st trimester	NT certified provider
	PAPP-A, hCG		Tri 18/13: 82%			
cfDNA screening	Sequencing of DNA	>10 weeks	Tri 21: >99% Tri 18: 98% Tri 13: 99%	0.13%	Highest DR Low FPR in high risk women	Expensive PPV/NPV not reported
Second trimester Quad screen	hCG, AFP, uE3, DIA	15–22 weeks	Tri 21: 81% Tri 18: 69%	5%	Relatively inexpensive No US required	Results delayed to 2nd trimester; Lowest DR
Anatomy ultrasound	Fetal anatomy	18–20 weeks	Tri 21: 50%	—	Identify structural anomalies	Lack of standardization Variation between providers

NT, nuchal translucency; tri 21, trisomy 21; tri 18, trisomy 18; PAPP-A, pregnancy-associated plasma protein A; hCG, human chorionic gonadotropin; cfDNA, cell-free DNA; DR, detection rate; FPR, false-positive rate; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; AFP, alpha-fetoprotein; uE3, unconjugated estriol; DIA dimeric inhibin A; US, ultrasound.

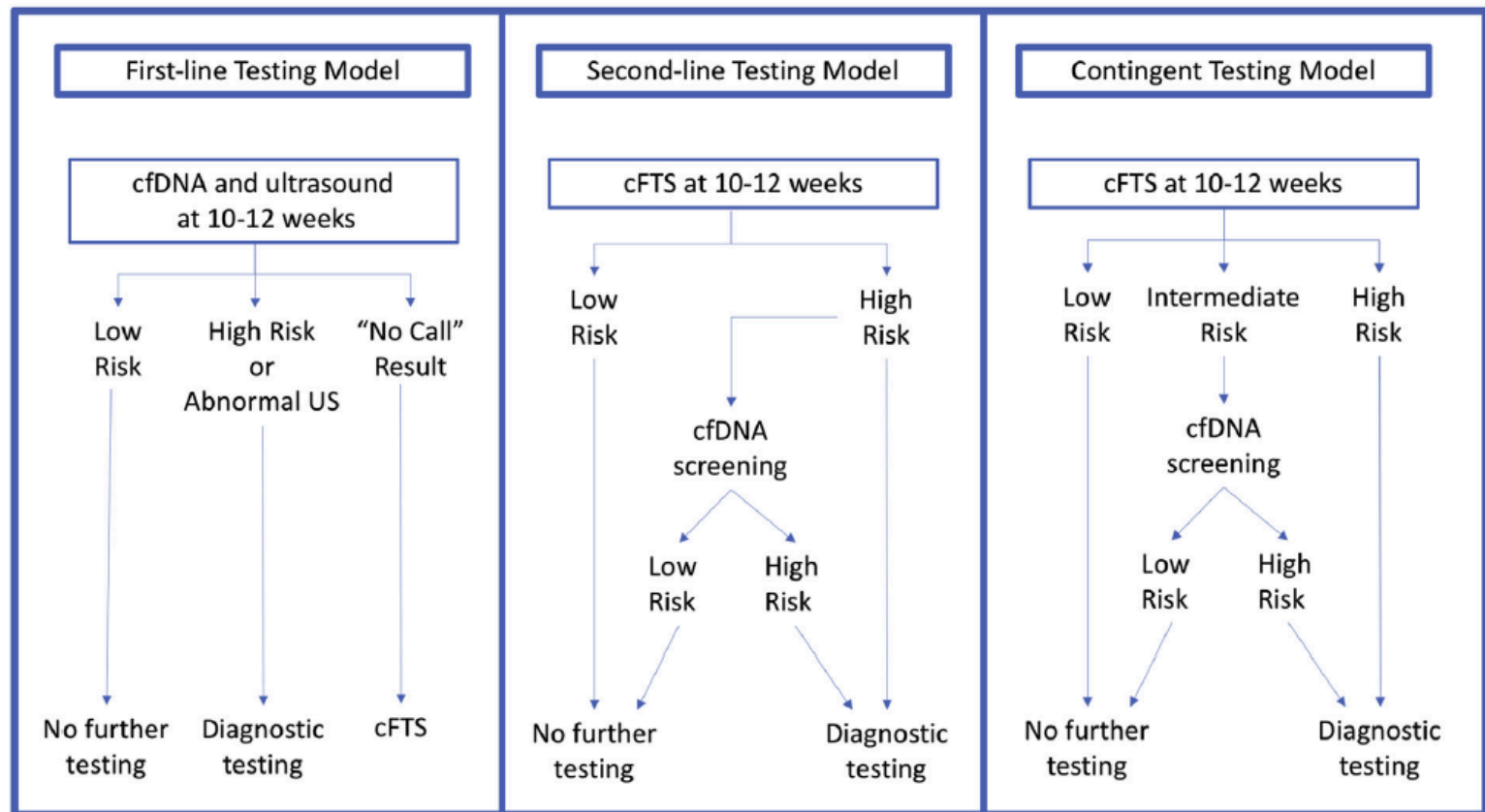
Source: American College of Obstetricians and Gynecologists [21]; Gil et al. [22].

Table 4

Meta-analysis and performance of screening for sex chromosome aneuploidies.

Aneuploidy	Included data	Detection rate ^a (95% CI)	False-positive rate ^a (95% CI)
Monosomy X	11 studies 36 cases of monosomy X 7677 with no monosomy X Singleton pregnancies	95.8% (70.3–99.5%)	0.14% (0.05–0.38%)
Other sex chromosomal aneuploidy	8 studies 17 affected sex chromosome aneuploidies 5383 non-sex chromosome aneuploidies singleton pregnancies	100% (83.6–100%)	0.003% (0–0.07%)

^a Pooled weighted detection rate and false-positive rate from Gil et al. [22].



2. Various models for the incorporation of cell-free DNA (cfDNA) screening into aneuploidy screening programs. ultrasound; cFTS, combined first-trimester screening.

Review

Open Access

Ioanna Kotsopoulou^a, Panagiota Tsoplou^a, Konstantinos Mavrommatis and Christos Kroupis*

Non-invasive prenatal testing (NIPT): limitations on the way to become diagnosis

Celulas fetais

- 10% do DNA materno
 - Taxas de falsos negativos
 - SNPs 6,29% X seletivo cromossomo 3,56% X genoma 1,56%
 - IMC
 - Patologia trissomia do 21 (maior)
 - Idade gestacional
 - Idade materna
 - Prevalencia da doença
 - Bioinformatica

Quantidade de DNA fetal

Falso positivo??????

Review article

Confined placental mosaicism

Dagmar K Kalousek, Michel Vekemans

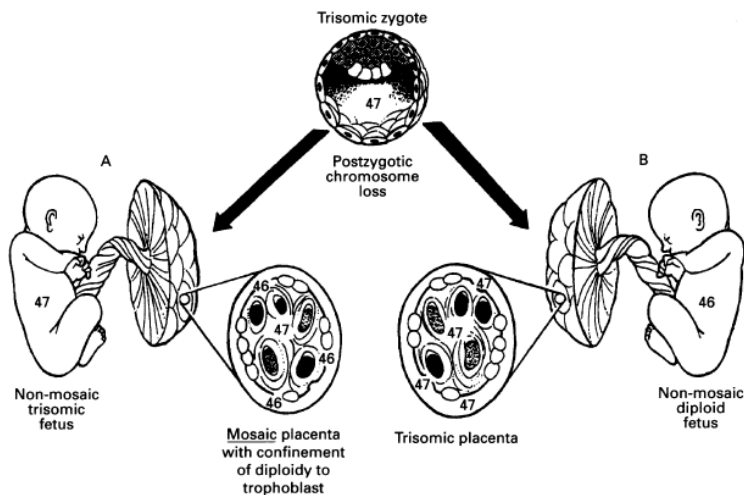


Figure 2 Diagram illustrating trisomic zygote rescue. (A) Intrauterine survival of trisomic fetus correlates with the presence of a diploid cell line in the cytotrophoblast owing to early postzygotic mitotic loss of the trisomic chromosome. (B) A mitotic mutation in the embryonic progenitor cells results in a diploid fetus and trisomic placenta.

E outras situações?

- Trissomias do cromossomo 16, 22
 - Perda fetal precoce
 - Grave RCIU
 - Mosaicismo confinado a placenta
- Cromossomopatias sexuais
 - Fenotipos diversos
 - Compatível com a vida
- Cromossomopatias submicroscópicas
 - del22q.11
 - Fenotipos diversos
 - Compatível com a vida



TESTE POSITIVO !!!!!



**CONFIRMAÇÃO
TESTES INVASIVOS**

OUTROS TESTES

Cariotipo X CGH array

- Detecta deleções e duplicações
 - Síndromes reconhecíveis
 - Resultado direto
 - Associado frequentemente a malformações fetais
- Detecta microdeleções e microduplicações
 - Síndromes reconhecíveis X síndromes novas?
 - Resultados incertos
 - Perda de heterozigose
 - Numero de copias variantes (CNVs)
 - Em 6% tem malformações associadas

Informações pré e pós teste Aconselhamento Genetico

- TESTE DE TRIAGEM
 - Taxas de falsos positivos e negativos
 - Valor preditivo positivo e valor preditivo negativo

ACHADOS INESPERADOS
MOSAICISMO CONFINADO A PLACENTA
CNVS materna
ANEUPLODIA SEXUAL MATERNA
CANCER MATERNO

Indicações do NIPT teste

- Casos selecionados
- Idade materna
- Pais com translocação
- US alterado
- Historia previa de cromossomopatia
- Outras: paternidade, casal consanguineo com historia familiar
- Estudo sobre aumento do DNA fetal: pré eclampsia, parto prematuro, RCIU, hiperemese..





Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Fetal & Neonatal Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/siny



Ethical considerations in prenatal testing: Genomic testing and medical uncertainty

Anastasia Richardson ^a, Kelly E. Ormond ^{b, *}

^a Lucile Packard Children's Hospital Stanford, Fetal and Pregnancy Health Program, Palo Alto, CA, USA

^b Stanford University School of Medicine, Department of Genetics and Stanford Center for Biomedical Ethics, Stanford, CA, USA

Qual objetivo do teste?

Qual exame escolher?

Discutir possíveis resultados incerto X início tardio X fenótipos variados

Necessidade de fazer outros exames

Não maleficiência

TAKE HOME MESSAGES

- Não é um teste diagnostico = triagem
- Nao detecta alteraçoes especificas cromossômicas, por exemplo translocações
- Teste negativo não exclui!!
- A escolha do teste
- Associar outros testes
- Fatores complicadores
 - não faz triagem para defeitos de tubo neural (US e AFP)



Obrigada!!!



lapagesselou@gmail.com