



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

## MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

---

2011/2012

Sara Homem de Melo Marques  
ADN fetal livre no sangue materno e  
diagnóstico pré-natal não invasivo –  
uma realidade

março, 2012

# FMUP



FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Sara Homem de Melo Marques  
ADN fetal livre no sangue materno e  
diagnóstico pré-natal não invasivo –  
uma realidade

**Mestrado Integrado em Medicina**

**Área: Genética Médica**

**Trabalho efetuado sob a Orientação de:  
Professor Doutor Sérgio Castedo**

**Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:  
Acta Obstetrica e Ginecologica Portuguesa**

março, 2012

**FMUP**

## Projeto de Opção do 6º ano - DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Eu, **Sara Homem de Melo Marques**, abaixo assinado, nº mecanográfico **060801132**, estudante do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que **NÃO** incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 19/03/2012

Assinatura: \_\_\_\_\_

Sara Marques

**Projecto de Opção do 6º ano – DECLARAÇÃO DE  
REPRODUÇÃO**

**Nome:** Sara Homem de Melo Marques

**Endereço electrónico:** med06132@med.up.pt **Telefone ou Telemóvel:** +351 910562145

**Número do Bilhete de Identidade:** 12988614

**Título da ~~Dissertação~~/Monografia** (cortar o que não interessa): ADN fetal livre no sangue materno e diagnóstico pré-natal não invasivo – uma realidade

**Orientador:** Prof. Dr. Sérgio Manuel Madeira Jorge Castedo

**Ano de conclusão:** 2011/2012

**Designação da área do projecto:** Genética Médica

É autorizada a reprodução integral desta ~~Dissertação~~/Monografia (cortar o que não interessar) para efeitos de investigação e de divulgação pedagógica, em programas e projectos coordenados pela FMUP.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 19/03/2012

Assinatura: \_\_\_\_\_

Sara Marques

**TÍTULO:** ADN fetal livre no sangue materno e diagnóstico pré-natal não invasivo – uma realidade

**TITLE:** Cell-free fetal DNA in the maternal blood and non-invasive prenatal diagnosis – a reality

**Autora:** Sara Homem de Melo Marques

Aluna da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

**Contato eletrónico:** med06132@med.up.pt

**Telemóvel:** +351 910562145

**Morada institucional:** Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Alameda Professor Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto

**Agradecimentos:** A autora agradece ao Prof. Dr. Sérgio Castedo pela sua disponibilidade e orientação durante a realização desta monografia. Agradece ainda à sua família e amigos pelo carinho e apoio incondicionais.

## ÍNDICE

RESUMO .....	2
PALAVRAS-CHAVE.....	2
ABSTRACT .....	3
KEY-WORDS .....	3
LISTA DE ABREVIATURAS .....	4
INTRODUÇÃO .....	5
MÉTODOS .....	6
ADN FETAL LIVRE E SUA DETEÇÃO NO SANGUE MATERNO .....	6
PRINCIPAIS APLICAÇÕES .....	8
1. Determinação do Sexo Fetal .....	8
2. Determinação do Genótipo <i>RHD</i> fetal .....	9
3. Aneuploidias .....	10
4. Doenças Monogénicas.....	12
DPN NÃO INVASIVO EM PORTUGAL.....	13
QUESTÕES ÉTICAS .....	13
CONCLUSÃO .....	15

**RESUMO:** O diagnóstico pré-natal (DPN) baseia-se atualmente na análise de material biológico fetal colhido diretamente do útero por técnicas invasivas. Com vista a evitar o risco de abortamento associado a estas técnicas, têm vindo a ser desenvolvidos métodos de DPN não invasivos. Em 1997 foi identificada a presença ADN fetal livre na circulação das mulheres grávidas e, desde então, as suas aplicações na prática clínica não têm parado de crescer. Neste trabalho são descritas as atuais aplicações do ADN fetal livre no DPN, nomeadamente na determinação do sexo e genótipo *RHD* fetais, na deteção de aneuploidias e patologias monogénicas. São ainda discutidas as perspetivas relativamente ao futuro dos atuais métodos de DPN. Esta é uma área em rápida evolução e já com diversas aplicações. No entanto, os recursos técnicos necessários ao DPN não invasivo constituem uma limitação para muitos centros, para além de haver ainda questões éticas a resolver antes da sua aplicação universal. Apesar de o DPN não invasivo ser já uma realidade, não é previsível que, num futuro próximo, venha a substituir por completo as técnicas invasivas.

**Palavras-chave:** diagnóstico pré-natal; diagnóstico pré-natal não invasivo; ADN fetal livre

**ABSTRACT:** In the current health programmes, prenatal diagnosis involves analysis of fetal biologic material collected directly from the uterus by invasive methods. To eliminate the risk of miscarriage associated with these invasive procedures, various non-invasive prenatal diagnosis (NIPD) techniques are being developed. The presence of cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women was identified in 1997 and its applications in clinical practice have been growing ever since. This work summarizes the current clinical applications of cell-free fetal DNA analysis, namely for fetal sex and Rhesus D status determination, detection of fetal aneuploidies and monogenic diseases. The future role of current invasive methods is also discussed. NIPD is a rapidly expanding area which already has several clinical applications. However, the technical resources needed to perform NIPD still limit the activity of many centers and several ethical problems need to be addressed before its worldwide application. Although NIPD is already an accepted method for prenatal diagnosis it is unlikely that invasive methods will be totally replaced in the near future.

**Key-words:** non-invasive prenatal diagnosis; prenatal diagnosis; cell-free fetal DNA



## LISTA DE ABREVIATURAS

- BVC – biópsia das vilosidades coriônicas
- CGC – Centro de Genética Clínica
- DPN – diagnóstico pré-natal
- IC – intervalo de confiança
- ISPD – Sociedade Internacional de Diagnóstico Pré-Natal
- MeDiP – imunoprecipitação de ADN metilado
- MPS – *Massively Parallel Sequencing*
- NIPD – non-invasive prenatal diagnosis
- PCR – reação de polimerase em cadeia
- RhD – Rhesus D
- RMD – *digital relative mutation dosage*
- SNP – *single nucleotide polymorphism*

## INTRODUÇÃO

As atuais técnicas de diagnóstico pré-natal (DPN) de doenças genéticas baseiam-se na análise de material biológico fetal colhido diretamente do útero por amniocentese, biópsia das vilosidades coriônicas (BVC) ou cordocentese. Estes procedimentos são invasivos e, para o caso da amniocentese e da BVC, acarretam um risco de abortamento de cerca de 0,5-1%<sup>1</sup>, o qual apesar de reduzido, é significativo. A idade média das grávidas tem vindo a aumentar progressivamente nos últimos anos e constitui a indicação mais frequente para a realização destes testes de diagnóstico (61,3% dos casos em Portugal, por ocasião da última estatística publicada – 2009)<sup>2</sup>. No entanto, muitas mulheres continuam a optar por não ser submetidas a estas técnicas por terem medo de perder o filho ou pelo desconforto físico e psicológico que delas resulta<sup>3</sup>. Por forma a reduzir estes problemas, há já várias décadas que se procuram desenvolver métodos não invasivos de DPN.

A descoberta de células fetais em circulação na mãe, há cerca de 30 anos<sup>4</sup>, suscitou grande interesse, pois aparentemente estas constituiriam um ótimo substrato para análise da totalidade do genoma fetal. Contudo, a escassez destas células – 1 célula fetal por cada 10<sup>7</sup> células maternas<sup>5</sup> –, a verificação de que podiam permanecer na circulação materna durante vários anos após a gravidez<sup>5</sup> (podendo-se confundir com as de outras gravidezes) e a complexidade técnica em selecionar de forma inequívoca as células fetais, dificultou o desenvolvimento de técnicas para a sua aplicação no DPN. Em 1997, foi confirmada a presença de ADN fetal livre na circulação materna<sup>6</sup>, o que veio revolucionar o futuro do DPN não invasivo. Desde então, muitos progressos têm sido feitos nesta área e atualmente o ADN fetal livre já é utilizado como uma ferramenta no DPN.

Os objetivos deste trabalho são descrever as atuais aplicações do ADN fetal livre no DPN não invasivo e discutir as perspetivas relativamente ao futuro dos atuais métodos de DPN.

## MÉTODOS

Foi feita uma pesquisa na PubMed utilizando as palavras-chave “*non-invasive prenatal diagnosis*”, “*noninvasive prenatal diagnosis*” e “*cell-free fetal DNA*”. Após leitura dos resumos, pela sua relevância, foram selecionados 72 artigos publicados entre Agosto de 1997 e Novembro de 2011. Foram ainda pesquisadas as listas de referências dos artigos selecionados. No total foram analisadas integralmente 101 publicações.

## ADN FETAL LIVRE E SUA DETECÇÃO NO SANGUE MATERNO

O ADN livre está presente na circulação de todas as pessoas. Trata-se de ADN fragmentado que é libertado para a circulação a partir das células quando ocorre apoptose<sup>7, 8</sup>. Em indivíduos saudáveis, a maior parte do ADN livre tem origem na medula óssea<sup>7</sup>, mas a sua quantidade aumenta em situações de lesão tecidual e maior renovação celular, como o cancro ou após um enfarte do miocárdio<sup>7</sup>.

Em mulheres grávidas, além dos fragmentos de ADN materno, que têm um tamanho maior que 500 pares de bases, existem em circulação nucleossomas com sequências de ADN com menos de 300 pares de bases que pertencem ao feto<sup>9, 10</sup>. A percentagem de ADN fetal em circulação na mãe varia entre 5 e 10% da totalidade de ADN livre<sup>11, 12</sup>, sendo mais elevada no primeiro e terceiro trimestres da gravidez<sup>13</sup>. Este ADN fetal livre é muito provavelmente originário do trofoblasto e da placenta, pois a sua presença na circulação materna pode ser detetada desde os 35 dias pós-conceção<sup>14</sup>, isto é, antes do estabelecimento da circulação materno-fetal, assim como em gestações anembrionadas<sup>15</sup>. Verificou-se ainda que, em casos de patologia da placenta, como a pré-eclâmpsia, a quantidade de ADN fetal livre está significativamente aumentada<sup>15</sup>.

A concentração de ADN fetal livre na circulação materna decresce rapidamente após a dequitação, apresentando uma semivida de 16 a 30 minutos<sup>16</sup> e desaparece na totalidade até às duas semanas do pós-parto<sup>17</sup>. Este aspeto faz com que este seja um bom substrato para o DPN

não invasivo, ao contrário das células fetais que podem persistir durante anos na circulação da mãe.

A distinção entre os fragmentos livres de ADN fetal e materno constituiu o primeiro grande desafio para o desenvolvimento de técnicas de DPN não invasivo. Como metade do genótipo fetal é de origem materna, as primeiras aplicações do ADN fetal livre no DPN não invasivo limitaram-se apenas à identificação de genes ou alelos que pudessem estar presentes no feto, mas nunca na mãe, tal como sequências do cromossoma Y, ou o gene *RHD* fetal em grávidas Rhesus D (RhD) negativas. Nestes casos, a presença dos genes em questão confirma a sua origem fetal. No entanto, a não identificação dos mesmos não exclui com segurança a sua presença no genoma fetal, podendo apenas significar que a amostra analisada não contém ADN fetal. Por forma a evitar os resultados falsos negativos foram desenvolvidos controlos internos para confirmar a presença de ADN fetal nas amostras. Para isso podem ser aproveitadas as diferenças epigenéticas entre genes placentares e maternos, em especial a metilação diferencial<sup>18</sup>. Por exemplo, a região promotora do gene supressor tumoral *RASSF1A* está hipermetilada no tecido placentário (de onde se origina o ADN fetal livre) e hipometilada nas células sanguíneas maternas<sup>19</sup>. O *RASSF1A* metilado é por isso um marcador universal do ADN fetal<sup>19</sup> e a sua presença na amostra de sangue materno a analisar indica com segurança a presença de ADN fetal livre.

Mais recentemente, o desenvolvimento das técnicas de contagem molecular recorrendo a equipamentos de sequenciação massiva passou a permitir analisar quantitativamente a totalidade do ADN livre em circulação, abrindo portas ao DPN não invasivo das mais variadas patologias monogénicas e aneuploidias.

## PRINCIPAIS APLICAÇÕES

### 1. Determinação do Sexo Fetal

A determinação por DPN não invasivo do sexo fetal pode fazer-se a partir da sétima semana de gestação<sup>20</sup> por pesquisa de sequências específicas do cromossoma Y no plasma materno – geralmente os genes *SRY* e *DYS14*<sup>21</sup>. A reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real é a técnica mais eficaz e fiável para amplificar estes genes<sup>20</sup>. A deteção das sequências de ADN do cromossoma Y no plasma materno indica a presença de um feto masculino e a sua ausência implica a presença de um feto feminino.

A determinação do sexo fetal por DPN não invasivo já é aplicada por rotina em muitos centros<sup>20</sup>, com bons resultados: sensibilidade de 95.4% (intervalo de confiança [IC] a 95%, 94.7%-96.1%) e especificidade de 98.6% (IC a 95%, 98.1%-99.0%)<sup>20</sup>.

Um estudo realizado em Inglaterra<sup>22</sup> demonstrou que, para a determinação do sexo fetal, quando comparados com os atuais métodos invasivos, os testes de DPN não invasivo não acarretam custos adicionais, apresentando ainda a vantagem de não expor muitas mulheres aos riscos dos primeiros.

A determinação ecográfica do sexo fetal também não é invasiva, mas esta técnica só permite ter precisão a partir das 12 semanas de gestação<sup>23</sup> e não é eficaz quando os genitais externos são ambíguos.

A identificação precoce do sexo fetal é importante em doenças ligadas ao cromossoma X e na hiperplasia suprarrenal congénita. Nas doenças ligadas ao cromossoma X, como a hemofilia e a distrofia muscular de Duchenne, a identificação de um feto do sexo feminino elimina a necessidade de a mulher ser submetida desnecessariamente a um teste de diagnóstico invasivo. Nos casos de hiperplasia suprarrenal congénita, a administração de dexametasona antes das nove semanas às mães portadoras de um feto feminino, impede a virilização fetal. A

determinação do sexo genético é também essencial quando as ecografias pré-natais mostram genitais externos ambíguos.

## **2. Determinação do Genótipo *RHD* fetal**

A PCR em tempo real também pode ser utilizada para amplificar sequências do gene *RHD* em grávidas RhD negativas, já faz parte da prática clínica em muitos centros, atinge sensibilidades de 94%-99,5% e especificidades de 99,5%-99,8%<sup>24</sup> e pode ser realizado com segurança a partir do segundo trimestre de gestação<sup>24,25</sup>. A presença de porções deste gene em circulação na mãe RhD negativa indica que o feto é RhD positivo e poderá estar em risco de doença hemolítica fetal, caso a mãe tenha sido previamente sensibilizada. Se o feto for RhD negativo, não são necessários mais testes ou precauções específicas. Foram reportados alguns falsos positivos devido à presença de pseudogenes amplificados como sequências RhD sem que se verificasse a produção da proteína, especialmente em mulheres africanas. Os atuais protocolos de PCR já têm em conta esta possibilidade e a região do genoma correspondente ao pseudogene não é amplificada<sup>16</sup>.

Os métodos de DPN invasivo são eficazes na determinação do genótipo *RHD* fetal. No entanto, podem aumentar a sensibilização da mãe para o RhD devido ao risco de hemorragia feto-materna<sup>26</sup>.

A administração sistemática da imunoglobulina anti-D a todas as grávidas RhD negativas quando o progenitor masculino é RhD positivo veio diminuir significativamente a taxa de isoimunização e a doença hemolítica. Foi estimado que na população caucasiana, 40% das mulheres RhD negativas recebem esta profilaxia desnecessariamente<sup>27</sup>. É conveniente que a imunoglobulina anti-D seja administrada criteriosamente, não só pelo seu custo, mas também porque é proveniente do sangue de doadores e por isso constitui uma possível fonte de infecções<sup>28</sup>. A determinação do genótipo *RHD* fetal por DPN não invasivo apresenta-se, neste contexto, vantajosa.

### 3. Aneuploidias

O risco de aneuploidias, em especial da trissomia 21, é a maior indicação para DPN e representa um maior desafio para o DPN não invasivo. Nestes casos é necessário quantificar o ADN proveniente de um cromossoma específico. Na prática, é possível identificar *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) originários do cromossoma em causa e calcular a razão entre os alelos maternos e paternos, o que permite determinar o número de cromossomas fetais presentes<sup>18, 29</sup>. Contudo, isto só é válido em fetos heterozigóticos para os polimorfismos a analisar e exige a separação entre ADN fetal livre e ADN materno livre<sup>18, 29</sup>, o que é difícil, dada a baixa percentagem de ADN fetal livre.

Em casos de trissomias fetais, a quantidade total de ADN livre (materno e fetal) proveniente do cromossoma em excesso será maior do que em situações normais. Tendo em conta que o ADN fetal livre constitui cerca de 10% de todo o ADN livre<sup>11, 12</sup>, se se analisarem 100 genomas no ADN livre proveniente de uma gravidez euplóide, encontraremos 200 cópias do cromossoma 21, 20 das quais de origem fetal<sup>29</sup>. No caso de um feto com trissomia 21, a mesma análise revelaria a existência de 210 cópias do cromossoma 21, sendo 30 de origem fetal<sup>29</sup>. As técnicas de quantificação molecular mais comumente utilizadas, não têm capacidade de discriminar este pequeno aumento (cerca de 5%) de sinal do cromossoma em excesso<sup>29</sup>. A *Massively Parallel Sequencing* (MPS) é uma tecnologia que sequencia milhões de moléculas de ADN de cada vez e identifica a origem cromossómica de cada uma delas, permitindo determinar a proporção de moléculas originárias de cada cromossoma<sup>30</sup>. A análise da totalidade do ADN livre em grávidas (materno e fetal) por MPS é capaz de detetar as pequenas alterações de sinal de um cromossoma em caso de aneuploidia<sup>30</sup>. Esta técnica ultrapassa os problemas descritos anteriormente e tem vindo a tornar-se progressivamente mais rápida e barata<sup>18</sup>.

Em 2011 surgiram quatro estudos<sup>31-34</sup> que validaram a MPS para a identificação de trissomia 21 num grande número de grávidas de alto risco (selecionadas após métodos clássicos de rastreio de aneuploidias) – sensibilidade e especificidade de 99% (IC a 95%, 98.2%-99.8%)<sup>34</sup>.

Em Outubro de 2011, passou a estar disponível um teste não invasivo para detecção pré-natal de trissomia 21 – ver <http://www.sequenomcmm.com/>. Segundo a Sociedade Internacional de Diagnóstico Pré-natal (ISPD), este teste não pode ainda ser considerado totalmente diagnóstico, sendo classificado como um teste de rastreio avançado que necessita de confirmação por um teste invasivo<sup>35</sup>. Ainda assim, a oferta do teste por MPS às grávidas de alto risco para trissomia 21 pode reduzir em 98% o número de procedimentos de DPN invasivo realizados<sup>31</sup> e reduzir consideravelmente os gastos pelo sistema de saúde<sup>34</sup>. Para uma aplicação generalizada destes testes são ainda necessários mais estudos em populações de baixo risco.

As duas aneuploidias mais frequentes depois da trissomia 21 são as trissomias 18 e 13. No entanto, foi constatado que, através da MPS, é difícil medir a quantidade de sequências provenientes de cromossomas com conteúdo muito elevado ou muito reduzido de GC, como é o caso dos cromossomas 18 e 13<sup>18, 36</sup>. Por isso, para estas duas aneuploidias é ainda necessário desenvolver protocolos fiáveis<sup>18, 31, 36</sup>.

Um grupo obteve resultados encorajadores recorrendo a uma técnica de enriquecimento em ADN fetal livre através da identificação de regiões diferencialmente hipermetiladas no ADN do cromossoma 21 fetal em comparação com o materno, recorrendo à imunoprecipitação de ADN metilado (MeDiP)<sup>37, 38</sup>. Utilizando a MeDiP em combinação com a quantificação por PCR em tempo real, foi possível identificar corretamente 14 casos de trissomia 21 e 26 casos normais em 40 gestações entre as 11 e as 14 semanas, obtendo 100% de sensibilidade e especificidade<sup>38</sup>. As técnicas da MeDiP e da PCR em tempo real são, em princípio, acessíveis à maioria dos laboratórios, sendo significativamente menos dispendiosas do que a MPS e poderão vir a ser utilizadas no DPN não invasivo de outras aneuploidias para além da trissomia 21<sup>38</sup>. No entanto, são necessários estudos em grande escala antes da introdução desta estratégia na prática clínica.



#### 4. Doenças Monogénicas

Inúmeras doenças causadas por mutações num único gene afetam cerca de 3,6 em cada 1000 nados vivos<sup>27</sup>. Atualmente, o rastreio das doenças monogénicas mais comuns faz parte dos planos de saúde das grávidas. Às famílias com história de doenças monogénicas raras é oferecida a análise da porção relevante do genoma fetal após colheita de material fetal por métodos invasivos.

O DPN não invasivo de doenças autossómicas dominantes transmitidas pelo pai é simples, pois, quando os alelos mutantes não estão presentes no genoma materno, só serão detetados na circulação materna se o feto os tiver herdado<sup>39, 40</sup>. Do mesmo modo, a ausência dos alelos paternos mutantes em circulação na mãe exclui a sua transmissão ao feto<sup>41-43</sup>. Estas estratégias não são eficazes na deteção de mutações autossómicas dominantes herdadas da mãe, nem na deteção de homozigotia para mutações autossómicas recessivas para as quais os progenitores são heterozigóticos.

Para ultrapassar as limitações referidas, para os casos em que a mãe é heterozigótica para uma determinada mutação, foi desenvolvida uma tecnologia que não requer a separação entre ADN materno e fetal livres, denominada *digital relative mutation dosage (RMD)*<sup>44, 45</sup>. Esta técnica consiste na adição de duas sondas – uma correspondente à mutação e outra à sequência normal – ao plasma materno e a sua análise por PCR digital, o que permite comparar a quantidade relativa de sequências mutantes e não-mutantes em cada amostra. Se o feto for heterozigótico como a mãe, é de esperar um equilíbrio entre as quantidades de alelo mutante e não mutante. Por outro lado, um excesso de representação do alelo mutante indica a sua presença no genótipo fetal (feto homozigótico para a mutação). De forma análoga, a sub-representação do alelo mutante sugere a presença de um feto homozigótico para o alelo não mutante.

A conjugação da técnica RMD com as técnicas de identificação de sequências paternas permite conhecer o genótipo fetal em qualquer situação, possibilitando o DPN não invasivo de um

grande número de doenças monogénicas<sup>18</sup>. No entanto, são necessários estudos de grandes séries para que se possa proceder à sua validação.

## **DPN NÃO INVASIVO EM PORTUGAL**

Em 2009, foram realizados em Portugal 10515 exames invasivos de DPN, dos quais resultaram 31 abortamentos de fetos potencialmente saudáveis<sup>2</sup>.

De acordo com os dados apresentados na Reunião dos Núcleos da Associação Portuguesa de Diagnóstico Pré-Natal, a 3 de dezembro de 2011 (Castedo S: Diagnóstico pré-natal não invasivo em Portugal – que futuro?), existem em Portugal três centros privados de genética – GDPN – Genética Médica e Diagnóstico Pré-Natal, CGC – Centro Genética Clínica e Grupo Joaquim Chaves – com alguma experiência em DPN não invasivo baseado no estudo do ADN fetal livre, sobretudo na determinação do sexo fetal. A genotipagem não invasiva do *RHD* fetal pode ser realizada no Hospital de São João – Porto e nos Hospitais da Universidade de Coimbra.

Os laboratórios acima referidos pretendem dar continuidade aos métodos de DPN não invasivo e esperam em breve poder vir a diagnosticar de forma não invasiva outras patologias. O Serviço de Genética da Faculdade de Medicina de Coimbra tem como plano iniciar também o DPN não invasivo e o Departamento de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto tem projetos de investigação em curso nesta área.

## **QUESTÕES ÉTICAS**

É inquestionável que o DPN não invasivo poderá permitir o diagnóstico precoce, seguro e célere de muitas das doenças genéticas<sup>46</sup>. Contudo, antes da implementação generalizada destes testes, é necessário considerar que o acesso ao genoma fetal levanta questões éticas relevantes, nomeadamente possíveis aplicações não médicas.

O DPN não invasivo para determinação do sexo fetal já está disponível em vários centros. Existem razões médicas que justificam a determinação precoce do sexo fetal. No entanto, pelas mais diversas razões pessoais, sociais e culturais, um casal pode querer escolher o sexo do filho<sup>47, 48</sup>, levando-o a abortar caso o resultado do teste de diagnóstico não seja o desejado. Na China, por exemplo, em 2005, o número de rapazes com menos de 20 anos excedia em 25 milhões o número de raparigas<sup>49</sup>. Em Portugal, a interrupção voluntária da gravidez é permitida até às 10 semanas e o DPN não invasivo para determinação do sexo fetal pode ser realizado depois das sete, criando-se assim uma janela de oportunidade para a seleção do sexo fetal.

Embora ainda não seja possível, é de prever que o DPN não invasivo venha a permitir antecipar se um feto terá determinada característica física ou predisposição para algumas doenças, como Diabetes Mellitus ou cancro<sup>48</sup>. Estas possíveis aplicações levantam questões quanto à proteção dos dados obtidos, à propriedade da informação e a quem poderá ter acesso a ela<sup>48, 50</sup>.

Um inquérito realizado a profissionais de saúde da área da Obstetrícia acerca do DPN não invasivo revelou que o nível de conhecimentos acerca do ADN fetal livre era baixo e que a atitude perante a possibilidade de os métodos de DPN não invasivo virem a ser implementados era de incerteza<sup>51</sup>.

Um outro grupo realizou um questionário a grávidas acerca da possibilidade de serem submetidas a técnicas de DPN não invasivo<sup>52</sup>, concluindo que a maior parte das mulheres apresentava interesse nestes procedimentos sobretudo pela maior segurança para o feto, mas cerca de 25% não tinham qualquer opinião sobre o tema.

À semelhança do que se passa com o DPN invasivo, qualquer casal que pretenda esta nova forma de DPN deverá ser informado do interesse e limitações das técnicas disponíveis, em sessões de aconselhamento genético e deverá ser obtido o seu consentimento informado<sup>3</sup>.

Por tudo isto, é necessário que antes da introdução generalizada do DPN não invasivo, os profissionais de saúde e o público em geral sejam devidamente esclarecidos acerca destes procedimentos e quais as suas implicações, no sentido de obter um consenso quanto às

indicações que realmente justificam o DPN não invasivo e normas que regulamentem a sua aplicação.

## CONCLUSÃO

Desde a descoberta do ADN fetal livre em circulação na mãe, a área do DPN não invasivo não parou de crescer e têm surgido inúmeras aplicações novas. O DPN não invasivo já é uma realidade, pois para a determinação do sexo fetal e do genótipo *RHD* fetal é considerada má prática não oferecer esta possibilidade às grávidas. Relativamente à trissomia 21, os testes estão já à disposição no mercado e, por agora, constituem sobretudo uma segunda linha de rastreio. É de prever que, com a sua aplicação em grande escala, venha a ser confirmada a sua fiabilidade, o que, a par da provável redução dos custos dos equipamentos necessários, irá seguramente contribuir para a sua instituição como testes de diagnóstico. Para as patologias monogénicas, o DPN não invasivo permite já a identificação segura das mutações de origem paterna, embora a deteção das restantes mutações ainda careça de validação.

A questão que se impõe é se o DPN não invasivo virá a substituir totalmente os atuais métodos invasivos. Quando comparados, o DPN não invasivo atinge resultados sobreponíveis aos do DPN invasivo, apresentando as vantagens de ser mais seguro e poder ser realizado mais precocemente. Apesar de os recursos técnicos necessários serem capazes de obter resultados cada vez mais rápido e o seu preço estar a diminuir, são ainda estes os pontos que limitam a sua aplicabilidade.

O número de amniocenteses e BVC poderá vir a diminuir significativamente, mas não é de esperar que, num futuro próximo, se venham a abandonar por completo as técnicas invasivas. Embora seja uma área em rápida evolução, a verdade é que, em face dos conhecimentos atuais, só o sexo fetal, o genótipo *RHD* fetal e a trissomia 21 podem ser diagnosticados com confiança de forma não invasiva.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alfirevic Z, Sundberg K, Brigham S. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev*2003(3):CD003252.
2. Divisão de saúde reprodutiva DGS. Diagnóstico Pré-Natal - Relatório de actividades realizadas nos serviços de saúde em 2009. 2010.
3. Kent A. Non-invasive prenatal diagnosis: public and patient perceptions. *Semin Fetal Neonatal Med*2008 Apr;13(2):109-12.
4. Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol*1999 Jun;105(3):574-83.
5. Bischoff FZ, Sinacori MK, Dang DD, Marquez-Do D, Horne C, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free fetal DNA and intact fetal cells in maternal blood circulation: implications for first and second trimester non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update*2002 Nov-Dec;8(6):493-500.
6. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*1997 Aug 16;350(9076):485-7.
7. Urato AC, Peter I, Canick J, Lambert-Messerlian G, Pulkkinen A, Knight G, Jeong YJ, Johnson KL, Bianchi DW. Smoking in pregnancy is associated with increased total maternal serum cell-free DNA levels. *Prenat Diagn*2008 Mar;28(3):186-90.
8. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, Rossier A, Chen XQ, Anker P. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci*2000 Apr;906:161-8.
9. Li Y, Di Naro E, Vitucci A, Zimmermann B, Holzgreve W, Hahn S. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA*2005 Feb 16;293(7):843-9.
10. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing. *Clin Chem*2010 Aug;56(8):1279-86.
11. Lun FM, Chiu RW, Allen Chan KC, Yeung Leung T, Kin Lau T, Dennis Lo YM. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*2008 Oct;54(10):1664-72.
12. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*1998 Apr;62(4):768-75.
13. Birch L, English CA, O'Donoghue K, Barigye O, Fisk NM, Keer JT. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. *Clin Chem*2005 Feb;51(2):312-20.
14. Illanes S, Denbow M, Kailasam C, Finning K, Soothill PW. Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Early Hum Dev*2007 Sep;83(9):563-6.
15. Alberry MS, Soothill PW. Non-invasive prenatal diagnosis: implications for antenatal diagnosis and management of high-risk pregnancies. *Semin Fetal Neonatal Med*2008 Apr;13(2):84-90.
16. Bianchi DW, Maron JL, Johnson KL. Insights into fetal and neonatal development through analysis of cell-free RNA in body fluids. *Early Hum Dev*2010 Nov;86(11):747-52.
17. Hui L, Vaughan JI, Nelson M. Effect of labor on postpartum clearance of cell-free fetal DNA from the maternal circulation. *Prenat Diagn*2008 Apr;28(4):304-8.
18. Chiu RW, Lo YM. Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age. *Semin Fetal Neonatal Med*2011 Apr;16(2):88-93.
19. Chan KC, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, Lau TK, Chim SS, Chung GT, Nicolaidis KH, Lo YM. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem*2006 Dec;52(12):2211-8.
20. Devaney SA, Palomaki GE, Scott JA, Bianchi DW. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*2011 Aug 10;306(6):627-36.

21. Finning KM, Chitty LS. Non-invasive fetal sex determination: impact on clinical practice. *Semin Fetal Neonatal Med*2008 Apr;13(2):69-75.
22. Hill M, Taffinder S, Chitty LS, Morris S. Incremental cost of non-invasive prenatal diagnosis versus invasive prenatal diagnosis of fetal sex in England. *Prenat Diagn*2011 Mar;31(3):267-73.
23. Akolekar R, Farkas DH, VanAgtmael AL, Bombard AT, Nicolaides KH. Fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA) at 11 to 13 weeks of gestation. *Prenat Diagn*2010 Oct;30(10):918-23.
24. Legler TJ, Muller SP, Haverkamp A, Grill S, Hahn S. Prenatal RhD Testing: A Review of Studies Published from 2006 to 2008. *Transfus Med Hemother*2009;36(3):189-98.
25. Kolialexi A, Tounta G, Mavrou A. Noninvasive fetal RhD genotyping from maternal blood. *Expert Rev Mol Diagn*2010 Apr;10(3):285-96.
26. Bombard AT, Akolekar R, Farkas DH, VanAgtmael AL, Aquino F, Oeth P, Nicolaides KH. Fetal RHD genotype detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma in non-sensitized RhD negative women. *Prenat Diagn*2011 Aug;31(8):802-8.
27. Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update*2009 Jan-Feb;15(1):139-51.
28. Rafi I, Chitty L. Cell-free fetal DNA and non-invasive prenatal diagnosis. *Br J Gen Pract*2009 May;59(562):e146-8.
29. Chiu RW, Cantor CR, Lo YM. Non-invasive prenatal diagnosis by single molecule counting technologies. *Trends Genet*2009 Jul;25(7):324-31.
30. Hahn S, Lapaire O, Tercanli S, Kolla V, Hosli I. Determination of fetal chromosome aberrations from fetal DNA in maternal blood: has the challenge finally been met? *Expert Rev Mol Med*2011;13:e16.
31. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, Leung TY, Sun H, Chan KC, Lun FM, Go AT, Lau ET, To WW, Leung WC, Tang RY, Au-Yeung SK, Lam H, Kung YY, Zhang X, van Vugt JM, Minekawa R, Tang MH, Wang J, Oudejans CB, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ*2011;342:c7401.
32. Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tynan JA, Cagasan L, Tim R, Lu V, McCullough R, McCarthy E, Nygren AO, Dean J, Tang L, Hutchison D, Lu T, Wang H, Angkachatchai V, Oeth P, Cantor CR, Bombard A, van den Boom D. Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol*2011 Mar;204(3):205 e1-11.
33. Sehnert AJ, Rhees B, Comstock D, de Feo E, Heilek G, Burke J, Rava RP. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clin Chem*2011 Jul;57(7):1042-9.
34. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, van den Boom D, Bombard AT, Deciu C, Grody WW, Nelson SF, Canick JA. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An international clinical validation study. *Genet Med*2011 Nov;13(11):913-20.
35. Benn P, Borrell A, Cuckle H, Dugoff L, Gross S, Johnson J, Maymon R, Odibo A, Schielen P, Spencer K, Wright D, Yaron L. Prenatal Detection of Down Syndrome using Massively Parallel Sequencing (MPS): a rapid response statement from a committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis. 2011 24 Oct.
36. Chen EZ, Chiu RW, Sun H, Akolekar R, Chan KC, Leung TY, Jiang P, Zheng YW, Lun FM, Chan LY, Jin Y, Go AT, Lau ET, To WW, Leung WC, Tang RY, Au-Yeung SK, Lam H, Kung YY, Zhang X, van Vugt JM, Minekawa R, Tang MH, Wang J, Oudejans CB, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. *PLoS One*2011;6(7):e21791.
37. Papageorgiou EA, Fiegler H, Rakyan V, Beck S, Hulten M, Lamnissou K, Carter NP, Patsalis PC. Sites of differential DNA methylation between placenta and peripheral blood: molecular markers for noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies. *Am J Pathol*2009 May;174(5):1609-18.

38. Papageorgiou EA, Karagrigoriou A, Tsaliki E, Velissariou V, Carter NP, Patsalis PC. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nat Med*2011 Apr;17(4):510-3.
39. Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet*2000 Sep 30;356(9236):1170.
40. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem*2000 Feb;46(2):301-2.
41. Bustamante-Aragones A, Gallego-Merlo J, Trujillo-Tiebas MJ, de Alba MR, Gonzalez-Gonzalez C, Glover G, Diego-Alvarez D, Ayuso C, Ramos C. New strategy for the prenatal detection/exclusion of paternal cystic fibrosis mutations in maternal plasma. *J Cyst Fibros*2008 Nov;7(6):505-10.
42. Bustamante-Aragones A, Trujillo-Tiebas MJ, Gallego-Merlo J, Rodriguez de Alba M, Gonzalez-Gonzalez C, Cantalapiedra D, Ayuso C, Ramos C. Prenatal diagnosis of Huntington disease in maternal plasma: direct and indirect study. *Eur J Neurol*2008 Dec;15(12):1338-44.
43. Nasis O, Thompson S, Hong T, Sherwood M, Radcliffe S, Jackson L, Otevrel T. Improvement in sensitivity of allele-specific PCR facilitates reliable noninvasive prenatal detection of cystic fibrosis. *Clin Chem*2004 Apr;50(4):694-701.
44. Lun FM, Tsui NB, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Charoenkwan P, Chow KC, Lo WY, Wanapirak C, Sanguansermsri T, Cantor CR, Chiu RW, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*2008 Dec 16;105(50):19920-5.
45. Zimmermann BG, Grill S, Holzgreve W, Zhong XY, Jackson LG, Hahn S. Digital PCR: a powerful new tool for noninvasive prenatal diagnosis? *Prenat Diagn*2008 Dec;28(12):1087-93.
46. de Jong A, Dondorp WJ, Frints SG, de Die-Smulders CE, de Wert GM. Non-invasive prenatal diagnosis for aneuploidy: toward an integral ethical assessment. *Hum Reprod*2011 Nov;26(11):2915-7.
47. Smith RP, Lombaard H, Soothill PW. The obstetrician's view: ethical and societal implications of non-invasive prenatal diagnosis. *Prenat Diagn*2006 Jul;26(7):631-4.
48. Benn PA, Chapman AR. Ethical challenges in providing noninvasive prenatal diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*2010 Apr;22(2):128-34.
49. Hesketh T. Selecting sex: the effect of preferring sons. *Early Hum Dev*2011 Nov;87(11):759-61.
50. de Jong A, Dondorp WJ, Frints SG, de Die-Smulders CE, de Wert GM. Advances in prenatal screening: the ethical dimension. *Nat Rev Genet*2011 Sep;12(9):657-63.
51. Sayres LC, Allyse M, Norton ME, Cho MK. Cell-free fetal DNA testing: a pilot study of obstetric healthcare provider attitudes toward clinical implementation. *Prenat Diagn*2011 Nov;31(11):1070-6.
52. Tischler R, Hudgins L, Blumenfeld YJ, Greely HT, Ormond KE. Noninvasive prenatal diagnosis: pregnant women's interest and expected uptake. *Prenat Diagn*2011 Dec;31(13):1292-9.

# **ANEXOS**



# ACTA OBSTETRICA E GINECOLOGICA PORTUGUESA

Órgão oficial da Federação das Sociedades Portuguesas de Obstetrícia e Ginecologia  
Official journal of the Federation of Portuguese Societies of Obstetrics and Gynecology

## REGRAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS

### REGRAS GERAIS

1. Os artigos deverão ser **submetidos exclusivamente** à Acta Obstétrica e Ginecológica Portuguesa, não podendo estar a ser simultaneamente considerados para publicação noutra revista. Serão considerados para publicação artigos que foram previamente rejeitados noutras revistas e os autores são livres de submeter os artigos não aceites por esta revista a outras publicações.
2. Todos os artigos são submetidos à revista por iniciativa dos seus autores, excepto os artigos de revisão que poderão também ser elaborados a convite dos Editores.
3. Os dados constantes do artigo não podem ter sido previamente publicados, total ou parcialmente, noutras revistas. Deste âmbito, exclui-se a publicação sob forma de resumo em actas de reuniões científicas.
4. Os autores poderão no prazo de 3 meses re-submeter uma única vez os artigos rejeitados pela revista, os quais serão encarados como novas submissões.
5. Os **requisitos para autoria** de artigos nesta revista estão em consonância com os *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*, disponível em [www.icmje.org/icmje.pdf](http://www.icmje.org/icmje.pdf).
6. Os autores são responsáveis pela verificação cuidadosa dos textos na primeira submissão, bem como nas eventuais versões modificadas e nas provas finais do artigo.

### SUBMISSÃO ONLINE DE ARTIGOS

1. Os artigos são submetidos exclusivamente na página de submissões da revista em [www.editorialmanager.com/aogp](http://www.editorialmanager.com/aogp).
2. A revista aceita cinco tipos diferentes de artigos:
  - ESTUDO ORIGINAL
  - ARTIGO DE REVISÃO
  - CASO CLÍNICO
  - ARTIGO DE OPINIÃO
  - CARTA AO EDITOR
3. Todos os artigos necessitam de um **título em Inglês** que não pode exceder 150 caracteres incluindo espaços.
4. A **lista de autores** deve incluir o **primeiro** e **último(s) nome(s)** de cada um, juntamente com as funções académicas e hospitalares actuais. Para os artigos de revisão, artigos de opinião e casos clínicos não se aceitam mais do que **5** autores. Para os estudos originais são aceites até **8** autores, podendo este número ser excedido em estudos corporativos que envolvam mais de dois centros. Um dos autores é designado "responsável pela correspondência" e os seus contactos devem ser fornecidos na página de submissões da revista.
5. Os estudos originais, artigos de revisão, artigos de opinião e casos clínicos necessitam de incluir um **resumo em inglês** que não pode exceder 300 palavras. Este texto não pode incluir qualquer referência aos autores ou à instituição onde o estudo foi realizado. A estrutura é diferente de acordo com o tipo de artigo:
  - **ESTUDO ORIGINAL** – parágrafos com os títulos **Overview and Aims, Study Design, Population, Methods, Results, and Conclusions**.
  - **OUTROS** – estrutura livre.
6. Os estudos originais, artigos de revisão, artigos de opinião e casos clínicos necessitam de incluir 1 a 5 **palavras-chave**, segundo a terminologia MeSH ([www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html](http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html)).
7. Todos os artigos necessitam de um **título em Português** que não pode exceder 150 caracteres incluindo espaços.
8. É necessário indicar o nome e localização da(s) **instituição(ões)** onde a investigação teve lugar.
9. É da responsabilidade dos autores informar os Editores de possíveis **conflitos de interesse** relacionados com a publicação, bem como de publicações anteriores dos dados.

## INFORMATION FOR AUTHORS

### GENERAL RULES FOR SUBMITTING ARTICLES

1. Manuscripts should be **submitted exclusively** to Acta Obstetrica e Ginecologica Portuguesa, and may not be under simultaneous consideration for publication in other journals. Manuscripts that have been previously rejected by other journals will be considered for publication, and authors are free to submit those that have been rejected by this journal elsewhere.
2. All manuscripts are submitted to the journal on the authors' initiative, except for revision articles that may also be submitted on invitation from the Editors.
3. Data presented in the manuscript must not have been previously published, in whole or in part, in another journal. This does not include publications in the form of abstract in proceedings of scientific meetings.
4. Authors may re-submit a rejected article once, within 3 months of the decision. Re-submitted articles will be considered as new submissions.
5. **Requirements for authorship** of manuscripts in this journal are in accordance with *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*, available at [www.icmje.org/icmje.pdf](http://www.icmje.org/icmje.pdf).
6. Authors are responsible for carefully checking their texts before first submission, as well as with subsequent revised versions, and in the final proofs of the manuscript.

### ONLINE SUBMISSION OF ARTICLES

1. Articles are submitted exclusively at the journal submission site: [www.editorialmanager.com/aogp](http://www.editorialmanager.com/aogp).
2. The journal accepts five different types of articles:
  - ORIGINAL STUDY
  - REVIEW ARTICLE
  - CASE REPORT
  - OPINION ARTICLE
  - LETTER TO THE EDITOR
3. All articles must contain a **title in English**, which should not exceed 150 characters in length, including spaces.
4. The **list of authors** should include their first and last name(s), together with current academic and hospital positions. No more than **5** authors are accepted for review articles, opinion articles and for case reports. For original studies up to **8** authors will be accepted, and this number may be exceeded in corporate studies involving more than two centres. One of the authors will be designated as "responsible for correspondence" and his/her contact information should be made available at the journal submission site.
5. Original studies, review articles, opinion articles and case reports must include an **abstract in English**, which should not exceed 300 words. The text must not include any reference to the authors or to the institution where research took place. The structure of the abstract varies according to the article type:
  - **ORIGINAL STUDY** – paragraphs with the headings **Overview and Aims, Study Design, Population, Methods, Results, and Conclusions**.
  - **OTHERS** – free structure.
6. Original studies, review articles, opinion articles and case reports must include 1-5 **keywords**, according to MeSH terminology ([www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html](http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html)).
7. All articles must include a **title in Portuguese**, which cannot exceed 150 characters in length, including spaces.
8. The names and locations of the **institution(s)** where research was conducted must be supplied.
9. It is the responsibility of authors to inform the Editors about potential **conflicts of interest** related with the publication, as well as about previous reports of the same data.

## PREPARAÇÃO DO TEXTO, TABELAS E FIGURAS

1. Os ficheiros submetidos com o texto principal do artigo, tabelas e figuras não devem ter qualquer referência aos autores ou à(s) instituição(ões) onde a investigação foi realizada.

2. Todos os textos submetidos devem ter **duplo espaço entre linhas**, usando a fonte **Times New Roman de 11 pontos**.

3. O **texto principal do artigo** tem estrutura e dimensão máxima (excluindo referências) de acordo com o tipo de artigo:

- **ESTUDO ORIGINAL** – secções divididas com os títulos: **Introdução, Métodos, Resultados e Discussão**; dimensão máxima **3000** palavras.
- **ARTIGO DE REVISÃO** – estrutura livre; dimensão máxima **5000** palavras.
- **ARTIGO DE OPINIÃO** – estrutura livre; dimensão máxima **1500** palavras.
- **CASO CLÍNICO** – secções divididas com os títulos **Introdução, Caso Clínico e Discussão**; dimensão máxima **1500** palavras.

4. As investigações que envolvem seres humanos ou animais devem incluir no texto uma declaração relativa à existência de aprovação prévia por uma **Comissão de Ética** apropriada. Com seres humanos é ainda necessário incluir uma declaração relativa à solicitação de **consentimento informado** dos participantes.

5. As **abreviaturas** devem ser empregues com moderação e definidas por extenso aquando da primeira utilização, tanto no resumo como no texto principal do artigo.

6. Devem ser sempre utilizados os nomes genéricos dos **medicamentos**, excepto quando o nome comercial é particularmente relevante. Neste caso, devem ser acompanhados do símbolo ®.

7. Os **equipamentos** técnicos, **produtos** químicos ou farmacêuticos citados no texto devem ser seguidos entre parentesis do nome do fabricante, cidade e país onde são comercializados.

8. No final do texto principal os autores podem incluir os **agradecimentos** que queiram ver expressos no artigo.

9. As **referências** deverão ser numeradas consecutivamente na ordem em que são mencionadas no texto, tabelas ou legendas de figuras, usando números arábicos em sobrescrito; exemplo <sup>1,2,3</sup>. Os artigos aceites para publicação mas ainda não publicados podem ser incluídos na lista de referências no formato habitual, usando o nome da revista seguido da expressão *in press*. As comunicações pessoais, abstracts em livros de resumos de congressos, páginas web e artigos ainda não aceites não podem ser incluídos na lista de referências.

- **ESTUDO ORIGINAL** – máximo de 50 referências.
- **ARTIGO DE REVISÃO** – máximo de 125 referências.
- **ARTIGO DE OPINIÃO** – máximo de 20 referências.
- **CASO CLÍNICO** – máximo de 20 referências.

10. A **lista des referências** deve seguir as normas do *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* [www.icmje.org/icmje.pdf](http://www.icmje.org/icmje.pdf). Os títulos das revistas são abreviados de acordo com a lista da National Library of Medicine, disponível em <http://nmlpubs.nlm.nih.gov/online/journals/lijweb.pdf>.

*Exemplo de artigos publicados em revistas:*

Grant JM. The whole duty of obstetricians. BJOG 1997;104:387-92.

*Exemplo de Capítulos de livros:*

Goldenberg RL, Nelson KG. Cerebral Palsy. In: Maternal-Fetal Medicine (4<sup>th</sup> Edition). Creasy RK, Resnik R (eds). WB Saunders;1999:1194-214.

11. Os **quadros** são submetidos em formato digital, separadamente do texto principal. Devem ser numerados sequencialmente em numeração romana (I, II, III, IV etc.) e não apresentar linhas verticais internas; as únicas linhas horizontais a incluir são na margem superior e inferior do quadro e após os títulos das colunas. Os dados contidos nos quadros e nas legendas devem ser concisos e não devem duplicar a informação do texto. As **legendas dos quadros** devem ser submetidas nos mesmos ficheiros dos quadros.

12. As **figuras** devem ser numeradas sequencialmente na ordem que aparecem no texto, usando numeração arábica (1, 2, 3, etc.) e submetidas em formato digital, em ficheiros separados do texto principal e dos quadros. Podem ser submetidas figuras a preto e branco ou a cores. As **legendas das figuras** devem ser submetidas dentro do texto principal, numa página separada, após as referências.

13. Após aceitação de um artigo, mas antes da sua publicação, os autores deverão enviar por email à revista o **Formulário de Garantia dos Autores**, disponível em [www.aogp.com.pt/authors\\_form.pdf](http://www.aogp.com.pt/authors_form.pdf), assinado por todos.

## CARTAS AO EDITOR

1. As cartas ao Editor referem-se em principio a artigos publicados nos últimos dois números da revista, mas poderão ocasionalmente também ser publicadas cartas sobre outros temas de especial interesse. Se for considerado relevante o Editor Chefe solicitará uma **resposta** dos autores do artigo original.

2. As cartas ao Editor e as respostas dos autores não devem exceder **750 palavras** nem **5 referências**.

## PREPARATION OF THE MANUSCRIPT, TABLES AND FIGURES

1. Uploaded files containing the main manuscript, tables and figures must not contain any reference to the authors or to the institution(s) where research was conducted.

2. All texts should be submitted **double spaced**, using an **11-point Times New Roman** font.

3. The structure and maximum dimensions (excluding references) of the **main manuscript** vary according to the type of article:

- **ORIGINAL STUDY** – separate sections with headings: **Introduction, Methods, Results and Discussion**; limit of **3000** words.
- **REVIEW ARTICLE** – free structure; limit of **5000** words.
- **OPINION ARTICLE** – free structure; limit of **1500** words.
- **CASE REPORT** – separate sections with headings: **Introduction, Case Report and Discussion**; limit of **1500** words.

4. All research involving human subjects or animals should contain a statement in the text regarding the existence of prior approval by an appropriate **Ethics Committee**. With human subjects it is also necessary to include a statement concerning the request of **informed consent** from participants.

5. **Abbreviations** should be used sparingly and written in full extent at first usage, both in the article's abstract and in the full body of the text.

6. **Drugs** should always be referred to by their generic names, except when the trade name is of particular relevance. In this case they should be accompanied by the symbol®.

7. Technical **equipments**, chemical or pharmaceutical **products** cited in the text should be followed in brackets by the name of the manufacturer, city and country where they are commercialised.

8. At the end of the main text, authors may include the **acknowledgments** that they would like published in the article.

9. **References** should be numbered consecutively in the order that they are first mentioned in the text, tables or figure legends, using arabic numbers in superscript; i.e <sup>1,2,3</sup>. Papers accepted for publication but not yet published may be cited in the reference list in the usual format, using the journal name followed by the words *in press*. Personal communications, abstracts published in congress proceedings, web pages, and articles submitted for publication but still under evaluation may not be cited as references.

- **ORIGINAL STUDY** – maximum of 50 references.
- **REVIEW ARTICLE** – maximum of 125 references.
- **OPINION ARTICLE** – maximum of 20 references.
- **CASE REPORT** – maximum of 20 references.

10. The **reference list** should follow the guidelines of the *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* [www.icmje.org/icmje.pdf](http://www.icmje.org/icmje.pdf). Journal titles should be abbreviated according to the National Library of Medicine list, available at <http://nmlpubs.nlm.nih.gov/online/journals/lijweb.pdf>.

*Example of articles published in scientific journals:*

Grant JM. The whole duty of obstetricians. BJOG 1997;104:387-92.

*Example of Book chapters:*

Goldenberg RL, Nelson KG. Cerebral Palsy. In: Maternal-Fetal Medicine (4<sup>th</sup> Edition). Creasy RK, Resnik R (eds). WB Saunders;1999:1194-214.

11. **Tables** are to be submitted in digital format, separately from the main manuscript. They should be numbered sequentially with roman numerals (I, II, III, IV etc.) and must not display internal vertical lines; the only horizontal lines that should appear are above and below the table, and following the column headings. Data contained in the tables should be concise and must not duplicate the information given in the text. **Table legends** should be submitted in the same files as the tables.

12. **Figures** should be numbered sequentially in the order that they appear in the text, using arabic numerals (1, 2, 3, etc.) and submitted in digital format, in separate files from those of the main manuscript and tables. Both black-and-white and colour figures may be submitted. **Figure legends** should be submitted within the main manuscript file, on a separate page, following the references.

13. After acceptance of an article, but before its publication, the authors must send to the journal by email the **Authors' Guarantee Form**, available at [www.aogp.com.pt/authors\\_form.pdf](http://www.aogp.com.pt/authors_form.pdf), signed by all.

## LETTERS TO THE EDITOR

1. Letters to the Editor usually refer to articles published in the last two issues of the journal, but those addressing other themes of special interest may occasionally be published. If considered relevant, the Editor-in-Chief will ask for a **reply** from the authors of the original article.

2. Letters to the Editor and replies from the authors should not exceed **750 words** nor **5 references**.