

# INVESTIGAÇÃO GENÉTICA DOS ABORTAMENTOS ESPONTÂNEOS PELO DNA

GENETIC INVESTIGATION OF SPONTANEOUS ABORTIONS BY DNA TECHNIQUES

SÉRGIO DANILO JUNHO PENA\*; HELENA BEATRIZ BELO LISBOA MARTINS DA COSTA\*\*;  
ELEN ROSE FONTOURA CARVALHO\*\*; ROSANE STURZENEKER\*\*\*

## RESUMO

Os abortamentos espontâneos são fenômenos comuns, mas emocionalmente devastadores. Uma explicação científica da causa da perda fetal é fundamental para o casal poder restaurar a sua homeostase emocional e para o médico orientar a sua conduta. Mais de 50% dos abortamentos apresentam anormalidades cromossômicas, especialmente trissomias (60%), triploidia (15%) e monossomia X (15%). Assim, o cariótipo fetal deve ser feito, se possível, em todos os casos de perda gestacional. Os estudos cromossômicos convencionais dependem da cultura de células fetais estar associada com falhas de crescimento *in vitro* e contaminação com células maternas. Uma alternativa vantajosa é a citogenética molecular, que estuda o cariótipo fetal diretamente ao nível do DNA, dispensando a cultura de tecidos e permitindo até a análise de espécimes fixados em formol, etanol ou incluídos em parafina. Este artigo descreve a implantação no GENE – Núcleo de Genética Médica – de uma metodologia própria de estudos genéticos de abortamentos usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e permitindo o diagnóstico das principais trissomias, da triploidia e da monossomia X. Neste trabalho fazemos uma revisão da análise de 1.096 abortamentos estudados por três protocolos diferentes: citogenética convencional (Protocolo 1), citogenética convencional + citogenética molecular (Protocolo 2), ou citogenética molecular isoladamente (Protocolo 3). O nosso objetivo foi comparar resultados obtidos após a implantação dos estudos moleculares com os resultados anteriores. A conclusão do estudo foi que o procedimento de citogenética molecular implantado é simples, eficiente e de baixo custo e representa uma ferramenta de grande utilidade clínica.

**Palavras-chave:** Abortamento; Perda fetal; Cromossomopatias; Citogenética; DNA

Abortamentos espontâneos são eventos comuns e ocorrem em 10% a 15% das gravidezes reconhecidas clinicamente.<sup>1</sup> Sabemos hoje que mais freqüentemente a sua causa é genética, e mais especificamente citogenética.<sup>2</sup> Boué e Boué<sup>3</sup>, em Paris, encontraram anomalias cromossômicas em 61% de 1.500 abortamentos de primeiro trimestre estudados. Da mesma maneira, Hassold et al.<sup>4</sup>, no Havaí, encontraram cromossomopatias em 50,5% de 2.919 fetos abortados com menos de 500g. Estes dois estudos basearam-se em culturas a longo termo de tecidos fetais, método sabidamente complexo e sujeito a falhas de cultura em mais de 30% dos casos. Utilizando o exame cromossômico com cultura a curto termo de vilosidades coriônicas, Ohno et al.<sup>5</sup> obtiveram um cariótipo em 92,3% dos abortos e observaram uma taxa de anormalidades cromossômicas mais alta ainda: 69,4%. É possível que os espécimes que não crescem em culturas *in vitro*

tenham maior probabilidade de ser cromossomicamente anormais.<sup>6</sup>

Em todos os estudos, a proporção de conceitos cromossomicamente anormais estava inversamente relacionada com o período gestacional. Assim, por exemplo, no segundo trimestre de gravidez, o número de abortos com defeito cromossômico cai para 25% a 30%. Por outro lado, na maioria dos trabalhos publicados, as freqüências dos vários tipos de anormalidade foram mais ou menos constantes. Fritz et al.<sup>6</sup> fizeram meta-análise de 19.920 casos da literatura e observaram que as trissomias (presença de um cromossomo extra) correspondiam a aproximadamente 59% dos abortos anormais, a monossomia X (45,X) correspondia a 15% e a triploidia (três cópias de todos os cromossomos), a 15%.

## QUAL A IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DAS PERDAS REPRODUTIVAS?

O abortamento, apesar de comum, é emocionalmente devastador e o seu impacto é intensificado quando a causa não é estabelecida. Isto ocorre porque, com freqüência, a perda fetal não é apropriadamente investigada. Embora esteja provado que mais de 50% dos abortamentos têm cariótipos anormais e os geneticistas há anos enfatizam a necessidade dos estudos citogenéticos das perdas reprodutivas, a verdade é que eles não se tornaram parte integral da rotina obstétrica, exceto para alguns especialistas com orientação mais acadêmica. Uma das razões é o fato de que, no passado, freqüentemente havia insucesso da cultura clássica de tecidos fetais a longo termo, então essencial para o estudo cromossômico. Hoje, isto não é mais verdade, graças aos avanços significativos em cultu-

\* Médico, Doutor em Genética Humana, pesquisador do GENE - Núcleo de Genética Médica de Minas Gerais – e do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais.

\*\* Bióloga do GENE - Núcleo de Genética Médica de Minas Gerais

\*\*\* Bióloga, Doutora em Bioquímica

GENE - Núcleo de Genética Médica de Minas Gerais

Endereço para correspondência:  
Prof. Dr. Sérgio Pena  
GENE - Núcleo de Genética Médica  
Av. Afonso Pena 3111, 9º andar  
Belo Horizonte, MG  
CEP: 30 130-909  
Tel.: (31) 3284-8000  
Fax: (31) 3227-3792  
E-mail: spena@gene.com.br

ras de curto prazo e em estudos diretos do DNA extraído dos tecidos fetais, mesmo contaminados, macerados ou fixados, garantindo um resultado conclusivo e útil na maioria dos casos, como demonstrado neste estudo.

A maior indicação para o estudo cromossômico dos tecidos fetais é o abortamento de repetição.<sup>7</sup> Nos Estados Unidos, 4% das mulheres casadas tiveram duas perdas fetais e 3% tiveram três ou mais perdas.<sup>8</sup> Nestes casos de recorrência torna-se essencial estabelecer se o abortamento está ou não relacionado com uma cromossomopatia. Na presença de cromossomopatia, a causa da perda fetal pode ser considerada como estabelecida e não há necessidade de fazer nenhuma investigação da mãe. Por outro lado, na ausência de uma alteração do cariótipo fetal, há indicação para investigações maternas, que devem incluir ultra-sonografia pélvica, estudos genéticos de trombofilia e anticorpos lúpicos anticoagulante e anti-cardiolipina.<sup>9</sup> Estudos hormonais são controversos.<sup>1</sup>

Entretanto, mesmo no primeiro abortamento, acreditamos que há justificativas para o estudo cromossômico fetal. O processo de luto após uma perda fetal é associado com ansiedade e depressão.<sup>10</sup> Nos casos em que a perda fica inexplicada, freqüentemente a paciente apresenta sentimentos de culpa e questiona se a perda fetal ocorreu porque ela fez ou deixou de fazer algo. Friedman e Gath<sup>11</sup> entrevistaram 67 mulheres quatro semanas após abortamento espontâneo e observaram a presença de depressão psiquiatricamente significativa em 32 delas (48%). Freqüentemente as seqüelas psicológicas também têm impacto negativo nas relações familiares, incluindo maridos e outros filhos.<sup>12</sup> O esclarecimento ao casal de que o abortamento foi causado por defeito cromossômico esporádico (“acidente genético”) e que a continuação da gravidez seria impossível ou culminaria no nascimento de uma criança anormal contribui significativamente para que haja aceitação da perda fetal. Devido a estas razões, acreditamos que todos os abortamentos devam ser submetidos a exames citogenéticos, assim permitindo o aconselhamento genético dos casais antes de uma nova gravidez.

#### DESENVOLVIMENTO DAS TÉCNICAS DE INVESTIGAÇÃO GENÉTICA DOS ABORTAMENTOS ESPONTÂNEOS PELO ESTUDO DIRETO DO DNA

Pelo exposto acima fica claro que, sempre que possível, todas as perdas reprodutivas devem ser investigadas citogeneticamente. Infelizmente, quando feitas com a citogenética clássica convencional, estas investigações são relativamente dispendiosas, demoradas e têm um percentual significativo de casos sem resultado. Isto acontece porque a citogenética convencional depende da disponibilidade de células humanas vivas e em processo ativo de

divisão celular, o que freqüentemente só é possível com a cultura dos tecidos fetais a longo termo no laboratório. As falhas de cultura são comuns porque os tecidos de abortamentos e natimortos estão freqüentemente macerados, contaminados com bactérias e/ou fungos, ou foram fixados em formol ou álcool. Neste estudo, verificamos se é possível usar testes baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para conseguir fazer o diagnóstico rápido de doenças cromossômicas humanas em DNA extraído de tecidos de fetos abortados e natimortos, sem necessidade de cultura de tecidos.

Em 1991, Mutter e Pomponio<sup>13</sup> iniciaram a citogenética molecular pela PCR ao desenhar um único par de iniciadores que promovia a amplificação do gene ZFY no cromossomo Y e o seu homólogo ZFX no cromossomo X, mas gerando produtos de tamanhos diferentes para cada um deles. Eles demonstraram que, além do diagnóstico do sexo, estas condições competitivas permitiam o diagnóstico molecular de indivíduos com cariótipo alterado 47, XXY (síndrome de Klinefelter) ou 47, XYY (dissomia Y), pois as quantidades relativas de produtos de amplificação de ZFX e ZFY tinham razões 2:1 e 1:2, respectivamente, em contraste com 1:1 em controles normais (46, XY). Obviamente, este enfoque experimental tão atraente, baseado na homologia peculiar apresentada entre os cromossomos sexuais X e Y, não era aplicável aos cromossomos autossômicos. Entretanto, Mansfield<sup>14</sup> observou que em indivíduos heterozigotos para microssatélites polimórficos (ver abaixo) um alelo podia servir como controle interno competitivo para o outro.

Os microssatélites são blocos de unidades repetitivas de DNA, contendo de uma a seis bases nucleotídicas, que são abundantes e altamente polimórficos em genomas eucariontes devido à variação no número de unidades repetitivas entre alelos.<sup>15</sup> Os locos de microssatélites são informativos para o diagnóstico de trissomias quando mostram a presença de mais de um alelo. Os indivíduos trissômicos apresentarão, em locos de microssatélites informativos, três alelos de intensidade aproximadamente igual ou dois alelos com dosagem relativa na proporção 2:1 (Figura 1). No primeiro caso, o diagnóstico é óbvio e fácil, enquanto que, no segundo caso, é quantitativo e depende de técnicas estatísticas.

Vários grupos de pesquisadores têm usado a amplificação pela PCR de microssatélites do cromossomo 21 para o diagnóstico da síndrome de Down<sup>14, 16-19</sup>, especialmente para o diagnóstico pré-natal em DNA extraído de células fetais do líquido amniótico ou de vilos coriônicas. No GENE – Núcleo de Genética Médica – nós desenvolvemos para o exame pré-natal em líquido amniótico obtido por amniocentese um protocolo diagnóstico para a trissomia 21 que permite a amplificação simultânea de

três microssatélites diferentes, *D21S11*, *D21S1270* e *IFNAR*, conjuntamente com *AMEL*.<sup>20</sup> Já temos seis anos de experiência com este procedimento, que permite um diagnóstico rápido (24-48 horas) e, assim, quando normal, alivia a ansiedade dos pais, já que os resultados da citogenética convencional, dependentes da cultura de células, demoram de 8 a 14 dias.

Da mesma maneira que para o diagnóstico da trissomia<sup>21</sup>, a citogenética molecular pode ser usada para o diagnóstico pré-natal das aneuploidias sexuais<sup>19</sup> e das trissomias 13 e 18.<sup>17,18</sup> Já emergiram na Europa propostas de utilização da citogenética molecular pela PCR como ferramenta única no diagnóstico pré-natal de trissomias. Mann et al.<sup>21</sup>, em Londres, publicaram em 2001 a experiência com o diagnóstico pré-natal das trissomias<sup>21, 18 e 13</sup> exclusivamente pela PCR em 1.314 casos. Nesta série não houve nenhum resultado falso-positivo nem falso-negativo.<sup>21</sup> Esta também é a experiência do GENE.

#### DIAGNÓSTICO DA SÍNDROME DE TURNER (45,X) PELO ESTUDO DIRETO DO DNA

O grupo de pesquisa do Laboratório de Genética Bioquímica na UFMG desenvolveu procedimento PCR multiplex que permite a amplificação simultânea de cinco microssatélites de dinucleotídeos localizados em uma região do braço longo do cromossomo X (Figura 2B). Os estudos populacionais demonstraram que a diversidade haplotípica em populações do Brasil, da África e da Europa era maior que 99%.<sup>22</sup> Assim, esperamos ver homoziguidade dos cinco locos em menos de 1% das mulheres normais. Por outro lado, esperamos ver a presença de um único pico em cada um dos cinco locos em todas as pacientes não-mosaicas com o cariótipo 45, X (Figura 2B), já que há perda de heteroziguidade por ausência de um cromossomo X. Assim, começamos a usar estes microssatélites para fazer a triagem de fetos para a síndrome de Turner.<sup>23</sup> Para confirmação deste teste baseado em microssatélites, empregamos o procedimento de PCR específica para metilação (Figura 2C), usando a metodologia descrita em detalhe previamente para diagnóstico da síndrome do X-frágil.<sup>24,25</sup>

#### Proposta do presente estudo

Este estudo descreve a implantação no GENE – Núcleo de Genética Médica – de protocolo de estudo genético de abortamentos e outras perdas reprodutivas pela citogenética molecular pela PCR. Como mostra-

mos acima, entre os abortamentos com cromossomopatias há três classes principais de defeitos: trissomias (Figura 1), monossomia X (Figura 2) e triploidia (Figura 3). A nossa estratégia era fazer o diagnóstico molecular das trissomias mais freqüentes, ou seja, daquelas acometendo os cromossomos 13, 16, 18, 21 e 22 (que conjuntamente perfazem aproximadamente 70% de todas as trissomias em abortamentos – Figura 1). O diagnóstico das triploidias seria feito usando a mesma ferramenta diagnóstica, ou seja, citogenética molecular por PCR com quantificação fluorescente (Figura 3). Não se constatando a presença de triploidia ou das trissomias testadas, todos os fetos do sexo feminino seriam estudados pelo procedimento de triagem da monossomia X, usando a reação multiplex de cinco microssatélites do braço longo do cromossomo X (Figura 2B). Nos casos com evidência molecular de monossomia X, seria, então, feita a confirmação do cariótipo 45,X com a PCR específica para metilação (Figura 2C).

No presente trabalho fazemos uma revisão de 1.096 abortamentos estudados no GENE no período 1990-2002. Estes casos foram estudados por três protocolos diferentes: citogenética convencional, citogenética convencional + citogenética molecular, ou citogenética molecular isoladamente. A conclusão do estudo foi que o protocolo de citogenética molecular desenvolvido é simples, eficiente e de baixo custo e que a sua implantação representou um progresso considerável na investigação genética dos abortamentos.

#### MATERIAIS E MÉTODOS

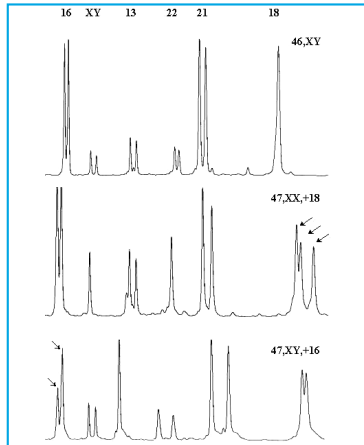
##### Materiais estudados

No período entre janeiro de 1990 e o final de junho de 2002, foram estudados no GENE – Núcleo de Genética Médica – 1.096 abortamentos em que a idade gestacional era conhecida, incluindo 1.008 perdas de primeiro trimestre e 88 perdas de segundo trimestre. Estes casos foram encaminhados com finalidades diagnósticas, de praticamente todo o território brasileiro. Trata-se de uma amostra populacional essencialmente de classe média ou classe média alta.

##### Citogenética convencional: cultura a curto termo

Todo o trabalho é realizado assepticamente em uma capela de fluxo laminar. O material de curetagem é colocado em uma placa de Petri estéril e examinado no microscópio invertido. As vilosidades coriônicas, se presentes, são cuidadosamente dissecadas. Uma pequena parte da amostra é então congelada para possível utiliza-

**Figura 1** - Citogenética molecular por PCR usando quantificação fluorescente de microssatélites polimórficos (QF-PCR). Foram utilizados em multiplex o loco da amelogenina nos cromossomos X e Y e microssatélites polimórficos dos cromossomos 16, 13, 21, 22 e 18. De cima para baixo vemos os traçados obtidos com um feto cromossomicamente normal (46,XY), um feto feminino com trissomia 18 (as setas mostram o padrão de três alelos) e um feto masculino com trissomia 16 (as setas mostram dois alelos em relação de área 1:2).

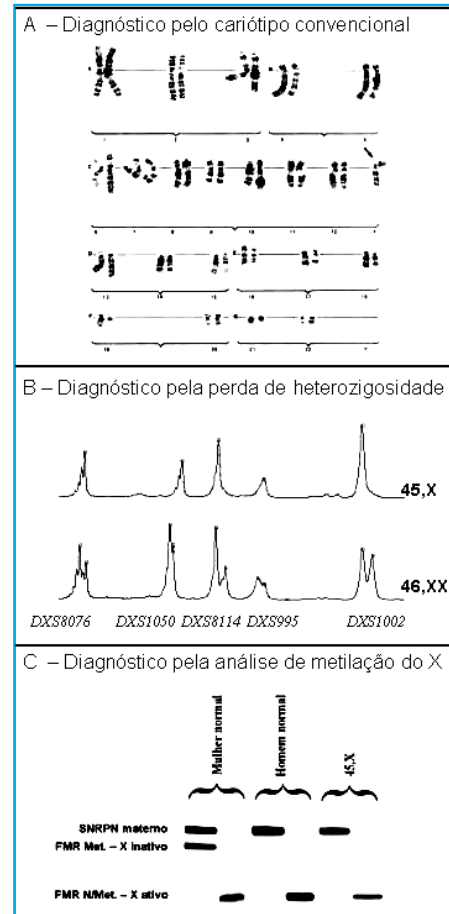


ção em citogenética molecular. Para cultura de curto termo, os vilos são transferidos para uma nova placa de cultura contendo 5ml de meio de cultura Amniomax (Invitrogen) e incubadas a 37°C na presença de 5% de CO<sub>2</sub> durante a noite. No dia seguinte, pela manhã, são adicionados 700 mg de colcemid e a placa é incubada a 37°C por 45 min. Após centrifugação, as vilosidades são tratadas seqüencialmente com solução hipotônica (10 ml de citrato de sódio 1%) e fixador [2 ml de ácido acético/metanol 1/3 (v/v)]. Após 6 lavagens com fixador, o material é pingado em lâminas resfriadas a 4°C de acordo com procedimento citogenético padrão. As lâminas são colocadas em placa aquecida a 60°C até o dia seguinte, quando então é iniciado o bandeamento GTG, usando tripsina e o método de coloração de Giemsa de acordo com procedimento citogenético padrão

**Citogenética convencional: cultura a longo termo**

Se vilosidades não são visualizadas no material fetal encaminhado ao laboratório, ou se não forem obtidas metáfases com a cultura a curto termo descrita acima, ou se for uma perda fetal mais tardia e tecidos do próprio feto (pele, *fascia lata*, músculo, etc.) tiverem sido encaminhados, é feita a cultura a longo termo. Tecidos fetais são identificados, cuidadosamente separados de tecidos maternos, e cortados em pequenos fragmentos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> (explantes), que são colocados em uma placa de cultura com uma gota de meio de cultura cada um, para mantê-los úmidos. Depois dos explantes estarem aderidos à placa de cultura, são adicionados cuidadosamente 2ml de meio Amniomax sobre eles, e as pla-

**Figura 2** - Diagnóstico da monossomia X (45,X) por três técnicas diferentes usadas neste trabalho: a citogenética convencional (A), a perda de heterozigidade diagnosticada por microssatélites do cromossomo X (B) e a análise de metilação do cromossomo X (C). Em mulheres normais, observamos um fragmento de 142 pb, que corresponde ao cromossomo X ativo (não-metilado) e também um produto de 84 pb que corresponde ao cromossomo X inativado. Como um controle interno indispensável, nós usamos iniciadores específicos para a versão materna metilada da ilha CpG do gene SNRPN no cromossomo 15 humano. Como na síndrome de Turner (igual ao caso de homens) há apenas um cromossomo X ativo (não-metilado), há no resultado um padrão molecular tipicamente masculino, ou seja, ausência do produto de 142 pb, com a presença apenas da banda de 84 pb.

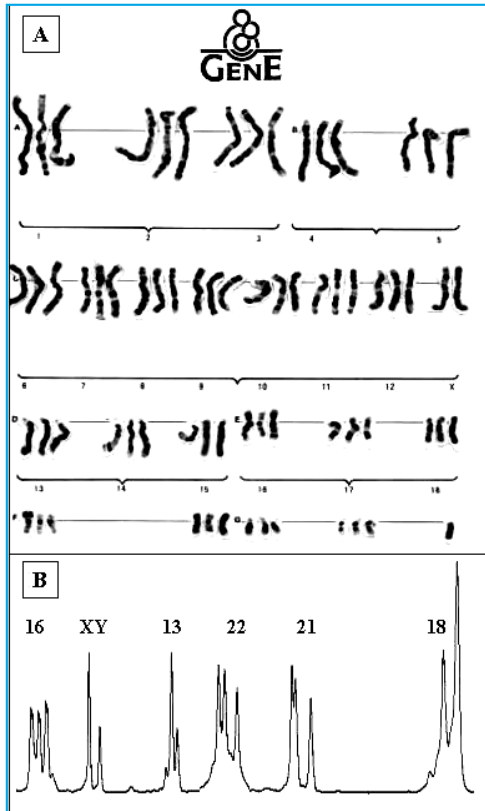


cas são mantidas em incubadora a 37°C na presença de 5% CO<sub>2</sub> até que fibroblastos migrem dos explantes para a superfície da placa. Quando há suficientes fibroblastos crescendo, a placa é processada para citogenética usando procedimentos rotineiros de preparação cromossômica *in situ*, seguido de bandeamento GTG por tripsina e giemsa. Caso não haja crescimento dos explantes após 3-4 semanas, é feita a extração de DNA dos mesmos para a realização dos testes de citogenética molecular.

**Diagnóstico molecular das trissomias fetais**

Para a realização dos testes de citogenética molecular pela PCR, o DNA é extraído das células fetais. Contanto

**Figura 3** - (A) Cariótipo fetal masculino mostrando a presença de 69 cromossomos (triploidia). (B) Diagnóstico molecular do mesmo feto mostrando trissomia dos cromossomos 16, 13, 22, 21 e 18 e um complemento sexual XXY. Observe padrões de três picos nos cromossomos 16, 22 e 21 e padrões de dois picos com diferenças quantitativas nos cromossomos 13 e 18, além do par XY.



que o DNA não esteja demasiadamente degradado, esta extração pode ser feita em tecidos frescos, secos, congelados, macerados, contaminados com bactérias ou fungos, fixados em formol ou etanol ou mesmo incluídos em parafina. Utilizando pinça e tesoura esterilizadas, separaram-se os tecidos fetais (vilosidades coriônicas, pele ou sangue fetal, restos placentários). Se o material fetal tiver vindo sem conservante, ou em álcool absoluto, são feitos então o lisado e a precipitação do DNA exatamente como descrito em detalhe por Pena et al.<sup>26</sup> Caso os tecidos fetais tenham vindo fixados em formol, a incubação em proteínase K é estendida por 72h. A extração de DNA para PCR de amostras incluída em parafina foi feito, pelo método descrito por Raedle et al.<sup>27</sup>, que utiliza pré-incubação com Triton X-100. Depois de o DNA ser extraído e dosado eletroforéticamente<sup>26</sup> é feita a primeira amplificação por PCR com a mistura C1 que inclui os locos amelogenina, D13S308, D16S2622, amelogenina, D18S51, D21S1446 e D22S685, respectivamente dos cromossomos X e Y, 13, 16, 18, 21 e 22. Os iniciadores

usados na PCR são marcados com o fluorocromo Cy5 e os produtos do sistema multiplex são resolvidos por eletroforese num densitômetro a laser computadorizado (Seqüenciador Automático ALF Express, Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). Adicionalmente, o GENE possui vários marcadores em reserva para casos em que algum microssatélite não seja informativo e também para confirmação diagnóstica, se necessário (Tabela 1).

**Diagnóstico do sexo fetal e de aneuploidias do cromossomo X**

**Tabela 1** - Locos de microssatélite usados na citogenética molecular pela Reação em Cadeia da Polimerase

Multiplex C1	
Cromossomos X e Y	Amelogenina
Cromossomo 13	D13S308
Cromossomo 16	D16S2622
Cromossomo 18	D18S51
Cromossomo 21	D21S1446
Cromossomo 22	D22S685
Multiplex LA	
Cromossomos X e Y	Amelogenina
Cromossomo 21	D21S11, D21S1270, D21S1280
Locos reserva	
Cromossomo 13	D13S258, D13S317, D13S631
Cromossomo 16	D16S535, D16S685
Cromossomo 18	D18S57, D18S535, D18S1270
Cromossomo 21	D21S1245, IFNAR, PENTA D
Cromossomo 22	D22S264, D22S941, D22S944

Nós temos usado os iniciadores desenhados por Sullivan et al.<sup>28</sup> para diagnosticar o sexo fetal de abortamentos. Pela incorporação do fluoróforo Cy5 durante a PCR podemos usar o seqüenciador automático para quantificar os produtos de amplificação do X e do Y e verificar o sexo fetal, além de fazer o diagnóstico molecular da síndrome de Klinefelter (47, XXY) ou da dissomia Y (47, XYY).

**Diagnóstico molecular da monossomia X (síndrome de Turner)**

Quando os testes para trissomias e triploidia são normais e o sexo fetal é feminino, são sempre realizados estudos moleculares adicionais para o diagnóstico de uma possível monossomia X (45,X), uma das causas mais comuns de abortamento. Inicialmente é utilizada a reação multiplex de cinco microssatélites do braço longo do cromossomo X, exatamente como descrito em Pereira et al.<sup>23</sup> Nos casos em que um único pico é visto em cada um dos microssatélites é feita então a confirmação do cariótipo 45,X com a PCR específica para metilação, utilizando a metodologia descrita por Pena e Sturzeneker.<sup>24, 25</sup>

**Definição dos protocolos**

Neste trabalho fazemos uma revisão da análise de 1.096 abortamentos estudados por três protocolos diferentes que foram adotados seqüencialmente. O Protocolo 1, que vigorou de 1990 a 1996, baseou-se no uso exclusivo da citogenética convencional. O Protocolo 2, que passou a vigorar a partir de 1997, estendendo-se até o presente, baseou-se no uso combinado da citogenética convencional e da citogenética molecular. Finalmente, o Protocolo 3, que era constituído pela citogenética molecular isoladamente, passou a ser usado a partir de 1999.

**Análise estatística**

Toda a análise estatística foi realizada no *VassarStats Web Site for Statistical Computation* (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>). Foi usado o teste exato de Fisher e o valor de P considerado significativo foi menor que 0,05.

**RESULTADOS**

**Protocolo 1**

O Protocolo 1 vigorou de 1990 a 1996 e efetivamente representa a era pré-molecular. Neste período foram estudados 500 casos de abortamento por cultura de curto termo de vilosidades coriônicas e/ou cultura a longo termo de explantes de outros tecidos fetais, seguidos, quando viável, de processamento para citogenética convencional. Quando a cultura de curto termo de vilosidades coriônicas não produzia metáfases, era então feita a cultura a longo termo dos tecidos fetais disponíveis, após cuidadosa dissecação. Os resultados obtidos com este protocolo estão mostrados em detalhe na Tabela 2. Como já esperado pelas estatísticas internacionais, não foram obtidos resultados em 28,4% dos casos (142 exames). Nos exames que permitiram um resultado, observamos 63 conceitos masculinos cromossomicamente normais (28,1%) e 161 conceitos femininos cromossomicamente normais (71,2%). Esta diferença é altamente significativa pelo teste exato de Fisher ( $Z = 4,7$ ;  $P = 0,000002$ ). A razão para esta diferença fica clara quando separamos os resultados das culturas a curto termo de vilosidades coriônicas (coluna “Vilos” na Tabela 2), com uma razão feminino/masculino de 1,02, e das culturas a longo termo (coluna “Cultura” na Tabela 2) com uma razão feminino/masculino de 0,13. Provavelmente, nas culturas a longo termo estava havendo crescimento de

células maternas femininas e citogeneticamente normais. Com base nesta observação, todos os laudos dos exames com resultado 46,XX eram acompanhados de explicação específica e também de sugestões relativas a necessidade de outros exames dos pais.

**Tabela 2** - Estudo genético de abortamentos feito exclusivamente por citogenética convencional. Período: janeiro 1990 - dezembro 1996

	Vilos	Cultura	Total	
Total de casos	216	284	500	100,0%
Falha de cultura	0	142	142	28,4%
Sem resultado	0	142	142	28,4%
Cariótipo normal	95	129	224	224/358=62,6%
46, XY	48	15	63	
46, XX	47	114	161	
Cariótipo anormal	121	13	134	121/216=56,0% <sup>a</sup> 134/358=37,4%
<b>Trissomia</b>	83	7	90	68,6% <sup>a</sup>
Trissomia 13	10	0	10	
Trissomia 16	25	4	29	
Trissomia 18	3	1	4	
Trissomia 21	14	0	14	
Trissomia 22	6	1	7	
47, XXY	2	0	2	(60) 49,6%
Outras trissomias <sup>b</sup>	23	1	24	19,0% <sup>a</sup>
45, X	12	4	16	9,9%
<b>Triploidia</b>	21	1	22	17,3%
<b>Tetraploidia</b>	1	1	2	0,8%
<b>Outros</b>	4	0	4	3,3%

<sup>a</sup> Estas percentagens referem-se exclusivamente aos resultados em vilosidades coriônicas (vilos)

<sup>b</sup> Inclui trissomias duplas

<sup>c</sup> Em negrito e itálico estão as anormalidades cromossômicas não detectáveis pelo protocolo molecular

Focalizando a nossa atenção somente nos resultados obtidos de vilosidades coriônicas, que apresentam menos vieses potenciais, podemos constatar a presença de anormalidades cromossômicas em 56,0% dos abortamentos, o que é completamente concordante com a literatura. Entre os conceitos cromossomicamente anormais encontramos 68,6% trissômicos, 9,9% com cariótipo 45,X e 17,3% triploides.

**Protocolo 2**

O Protocolo 2, que inclui os estudos de citogenética molecular pela PCR, passou a vigorar a partir de 1997 e foi usado no estudo de 298 perdas reprodutivas. Houve falhas de cultura em 94 casos (31,5%), conforme esperado pelos dados da literatura, e este percentual, inclusive, não difere significativamente dos 28,4% com o Protocolo 1 ( $Z = 0,9$ ;  $P > 0,30$ ). Entretanto, neste protocolo todos os casos em que houve falha de cultura foram ademais estudados pela citogenética molecular, com a conseqüência de que foi possível obter resultados em 296 das 298

perdas reprodutivas (>99%), um aumento espetacular em comparação com o Protocolo 1. Com a citogenética convencional no Protocolo 2 foram encontradas anormalidades cariotípicas em 49,5% dos conceptos, em concordância com os resultados do Protocolo 1. Por outro lado, com a citogenética molecular observamos anormalidades em apenas 24,5% dos casos. Entretanto, temos de considerar que a citogenética molecular tem foco exclusivo nos cromossomos 13, 16, 18, 21, 22, X e Y e, além disso, não é capaz de diagnosticar casos de tetraploidia nem translocações balanceadas. Dos 100 casos anormais detectados pela citogenética convencional, 30 não seriam passíveis de detecção pelo protocolo de citogenética molecular utilizado neste estudo (ver em **negrito e itálico** na Tabela 3), porque envolviam anomalias infrequentes. O protocolo adotado no GENE leva em conta a relação custo/benefício do exame e privilegia as cromossomopatias mais comuns nos abortamentos. Se omitirmos estes casos, indetectáveis pela citogenética molecular, de consideração, teríamos cariótipos anormais pela citogenética convencional em 70 de 202 conceptos, ou seja, 34,7%, que não é significativamente diferente dos 24,5% vistos com a citogenética molecular ( $Z = 1,7$ ;  $P > 0,14$ ). Além disso, como a citogenética molecular foi feita nos casos em que houve falha de cultura apenas, os dois grupos não são facilmente comparáveis.

**Tabela 3** - Estudo genético de abortamentos feito exclusivamente por citogenética convencional com utilização suplementar de metodologia molecular (PCR - Reação em Cadeia da Polimerase). Período: janeiro 1997 - junho 2002

Total de casos	298	100,0%		
Falha de cultura	94	31,5%		
Sem resultado	2	0,7%		
Cariótipo normal	173	173/296=58,4%		
	Convencional	Molecular	Total	
Cariótipo anormal	100/202 = 49,5%	23/94 = 24,5%	123	100% 123/296 = 41,6%
<b>Trissomia</b>	70	19	89	72,3%
Trissomia 13	8	4	12	
Trissomia 16	23	2	25	
Trissomia 18	5	6	11	
Trissomia 21	10	4	14	
Trissomia 22	5	1	6	
47, XXY	2	2	4	(72) 58,5%
Outras trissomias*	17	0	17	(17%) 15,4%
<b>45, X</b>	10	1	11	8,9%
<b>Triploidia</b>	7	3	10	8,1%
<b>Tetraploidia</b>	5	0	5	(5,0%) 4,1%
<b>Outros</b>	8	0	8	(8,0%) 6,5%

\* Inclui trissomias duplas

\* Em **negrito e itálico** estão as anormalidades cromossômicas não detectáveis pelo protocolo molecular

### Protocolo 3

O Protocolo 3, que inclui apenas estudos de citogenética molecular pela PCR, passou a vigorar a partir de 1999. De janeiro daquele ano a junho de 2002, foram estudados 298 abortamentos por este protocolo. Vários destes casos eram de espécimes que haviam sido fixados em formol ou álcool, ou mesmo incluídos em parafina para estudos anatomopatológicos ao microscópico. Foram observados 105 conceptos com cariótipos anormais, ou seja, uma taxa de anormalidade cariotípica de 35,2% (Tabela 4).

**Tabela 4** - Estudo genético de abortamentos feito pelo Protocolo 3, empregando a metodologia molecular (PCR - Reação em Cadeia da Polimerase). Período: janeiro 1999 a junho 2002

Total de casos	298	100,0%
Sem resultado	0	
Cariótipo normal	193	203/298 = 64,8%
Cariótipo anormal	105	100,0% 105/298 = 35,2%
<b>Trissomia</b>	46	44,2%
Trissomia 13	6	
Trissomia 16	17	
Trissomia 18	8	
Trissomia 21	13	
Trissomia 22	1	
47, XXY	1	
45, X	23	22,1%
<b>Triploidia</b>	36	34,6%

## DISCUSSÃO

### Eficiência da citogenética molecular

Este foi um estudo com controles seqüenciais, ou seja, o nosso objetivo era comparar resultados obtidos após a implantação dos estudos moleculares (Protocolos 2 e 3) com os resultados anteriores (Protocolo 1). Dois parâmetros básicos, determinantes da sensibilidade diagnóstica do procedimento, foram inicialmente analisados: proporção de casos com resultado definitivo e proporção de casos com anormalidade cromossômica.

O Protocolo 1, baseado na citogenética tradicional após cultura a curto ou longo prazo, representa o procedimento clássico de estudo de abortamentos e estabeleceu a nossa linha de base. A proporção de casos sem resultado, 28,4%, foi significativa, mas dentro do esperado, já descrito na literatura especializada. Na maioria dos casos isto se deveu a amostras inadequadas, com contaminação bacteriana, maceração pronunciada, ou mesmo ausência de tecidos fetais reconhecíveis. Em parte, este problema é relacionado com a falta de experiência dos médicos ao fazer a coleta, que não haviam recebido informações adequadas, ou que não haviam seguido os procedimentos de coleta recomendados. Sem dúvida, essa proporção de exa-

mes sem resultado, mesmo se esperada, era causa de frustração para os médicos, os pais e a própria equipe do GENE. Um outro problema com este protocolo é que a inadequação das amostras dificultava também a dissecação dos conceitos, de tal maneira que nas culturas a longo prazo havia o risco de crescimento de células maternas, como sinalizado pelo excesso de resultados femininos normais (Tabela 2). Como a contaminação com células maternas é sabidamente uma causa de resultados falso-negativos, em todos os resultados de cariótipo feminino normal em culturas a longo termo de abortamentos era incluída no laudo uma observação indicando esta possibilidade. Se concentrarmos a nossa atenção somente nos casos examinados pela cultura a curto prazo de vilosidades coriônicas, em que a contaminação materna não constitui uma fonte de erro, observamos anormalidades citogenéticas em 56% dos casos, o que é bem concordante com a literatura já citada.

O Protocolo 2 incluiu a utilização inicial da citogenética convencional, suplementada pela citogenética molecular quando não havia resultado com a primeira (Tabela 3). Os resultados da citogenética convencional com este protocolo podem ser juntados com os de vilosidades coriônicas da Tabela 2 para aumentar a casuística e torná-la mais confiável. Passamos assim a ter 221 casos anormais em 418 abortamentos estudados (52,9%), distribuídos da seguinte maneira: 69% trissomias, 12,7% triploidias e 10% monossomia X, o que se harmoniza muito bem com a literatura.

Para avaliarmos a eficiência e a sensibilidade dos estudos de abortamentos apenas pelo exame direto do DNA, precisamos então comparar os resultados da citogenética convencional conjuntamente das Tabelas 2 e 3 com os obtidos pelo Protocolo 3 (Tabela 4), que faz uso exclusivo de metodologia molecular e que tem as enormes vantagens de ser mais rápido, ter um custo muito menor (ver discussão a seguir) e de permitir resultado em virtualmente 100% dos casos, mesmo naqueles em que os tecidos fetais foram fixados em formol, álcool ou incluídos em parafina. A principal limitação da sensibilidade diagnóstica deste protocolo é o fato de que metodologicamente só é viável o diagnóstico das anormalidades cromossômicas mais comuns. Nós desenvolvemos técnicas moleculares para o diagnóstico de todas as triploidias, da monossomia X e das trissomias dos autossomos 13, 16, 18, 21 e 22 e dos cromossomos sexuais X e Y. Assim, entre os 221 casos anormais observados com a citogenética convencional (Tabelas 2 e 3), 58 (26,2%) são trissomias de outros autossomos, tetraploidias e arranjos estruturais, ou seja, apresentam anomalias não detectáveis pelo protocolo molecular em discussão (Protocolo 3). Isto estabelece um máximo teórico de sensibilidade ao redor de 74% para o protocolo molecular implantado no GENE. Efetivamente observamos 35,2% de anormalidades (Tabela 4) que, se cor-

rigido para a sensibilidade teórica de 74%, fornece taxa total estimada de anormalidades de 47,6%, que não é estatisticamente diferente dos 52,9% observados pela citogenética convencional ( $Z = 1,47$ ;  $P > 0,14$ ). Assim, concluímos que o protocolo de citogenética molecular está funcionando bem próximo de sua expectativa teórica.

#### QUAL DOS NOSSOS PROTOCOLOS É O IDEAL PARA ESTUDO DE ABORTAMENTOS?

Em termos de sensibilidade diagnóstica não há dúvida que o Protocolo 2 é o melhor, pois combina a alta sensibilidade metodológica da citogenética convencional, que permite o diagnóstico de todas as cromossomopatias, com a robustez da citogenética molecular, garantindo um resultado em virtualmente todos os espécimes. Entretanto, na prática clínica temos de levar em conta considerações de custo e benefício. Os exames de citogenética convencional são tecnicamente complexos e intensivos em trabalho manual e análise especializada ao microscópio, o que os torna muito mais dispendiosos que os exames moleculares. Para os pacientes, os exames moleculares isolados baseados na PCR (Protocolo 3) custam aproximadamente 50% dos exames de citogenética convencional (Protocolo 2), que incluem uma segunda etapa molecular na eventualidade de não se obter um diagnóstico pelo primeiro método. Assim, ao decidir qual estudo fazer, temos de primariamente levar em consideração a situação econômica da família e as indicações para o exame. Em casos de abortamento de repetição, sempre que financeiramente possível, deve ser empregado o Protocolo 2, pois é imperativo trabalhar com sensibilidade diagnóstica elevada para maximizar a probabilidade de obter resultado anormal conclusivo que possa orientar a conduta médica. No abortamento de repetição é especialmente importante usar metodologia capaz de diagnosticar rearranjos cromossômicos não-balanceados, que poderiam revelar a presença de translocação balanceada em um dos pais e assim elucidar a causa das perdas repetidas. Por outro lado, em casos de primeiro abortamento, o Protocolo 3 é o método de escolha quando uma economia financeira for importante. Outros elementos a serem levados em conta na escolha do exame são as condições de coleta dos tecidos fetais e a facilidade e rapidez do transporte deste material ao laboratório. Para citogenética molecular os tecidos têm de ser coletados de maneira rigorosamente estéril e encaminhados com urgência ao laboratório sem nenhum conservante, para garantir a viabilidade dos tecidos. Por outro lado, para utilização exclusiva das técnicas moleculares, a esterilidade não é tão fundamental e é perfeitamente aceitável a fixação dos tecidos fetais em etanol, o que elimina a urgência e permite o envio do material pelo correio, mesmo em localidades nas quais o serviço SEDEX não está disponível.

Qualquer que seja o protocolo usado, o nosso estudo demonstra claramente que a metodologia molecular desenvolvida pelo GENE, e já implantada em sua rotina diagnóstica, representa ferramenta de extraordinária utilidade clínica, que fez muito para tornar a investigação genética de abortamentos um exame perfeitamente adaptável à rotina clínica do obstetra moderno, independente de sua localização geográfica.

## SUMMARY

Spontaneous abortions are common, but emotionally devastating events. A scientific explanation of the cause of the fetal death is important for the parents to restore their emotional homeostasis and for the physicians involved to plan their conduct. More than 50% of miscarriages have chromosomal abnormalities, especially trisomies (60%), triploidy (15%) and monosomy X (15%). Thus, a fetal karyotype should be obtained in all abortions, if possible. Conventional chromosome studies depend on fetal cell cultures and are thus associated with growth failures in vitro and contamination with maternal cells. An advantageous alternative to conventional methods is molecular cytogenetics, which is based on studying the fetal karyotype directly at the DNA level. This has the advantage of dispensing with tissue culture and allows analysis even of specimens fixed in ethanol or formaldehyde or included in paraffin. We wish to describe the development at GENE – Núcleo de Genética Médica – of a methodology for the molecular cytogenetic study of miscarriages using the polymerase chain reaction (PCR), permitting the diagnosis of the most common trisomies, of triploidy and of monosomy X. In this article we review the results of 1,096 abortion specimens studies by one of three protocols: conventional cytogenetics (Protocol 1), conventional cytogenetics + molecular cytogenetics (Protocol 2) and molecular cytogenetics alone (Protocol 3). Our objective was to compare data obtained with molecular cytogenetics with previous results. The conclusion was that the protocols developed with the use of molecular techniques are simple, efficient and inexpensive and represent a tool of great clinical usefulness

**Keywords:** Abortions; Miscarriages; Chromosomal defects; Cytogenetics; DNA

## AGRADECIMENTOS

Os autores desejam agradecer a todos os outros integrantes da equipe técnica do GENE. Agradecem também a Betânia Maria Andrade Pena pela revisão do manuscrito, úteis sugestões e importantes discussões.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Simpson JL. Fetal wastage. In: Gabbe SG, Niebyl Jr, Simpson JL, editors. *Gabbe obstetrics: normal and problem pregnancies*. 4th. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2002. p.729-49.
- 2- Pena SDJ, Martins-da-Costa HBBL, Tiritilli SF. Investigação genética das perdas fetais. In: Isfer EV, Sanches RC, Saito M editors. *Medicina fetal*. São Paulo: Revinter; 1996. p. 14-21.
- 3- Boué A, Boué J. Evaluation des erreurs chromosomiques au moment de la conception. *Biomedicine* 1973; 18:372-7.
- 4- Hassold T. Chromosome abnormalities in human reproductive wastage. *Trends Genet* 1986; 2: 105-10.
- 5- Ohno M, Maeda T, Matsunobu A. A cytogenetic study of spontaneous abortions with direct analysis of chorionic villi. *Obstet Gynecol* 1991; 77: 394-8.
- 6- Fritz B, Hallermann C, Olert J et al. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation CGH; Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:539-47.
- 7- Wolf GC, Horger EO 3rd. Indications for examination of spontaneous abortion specimens: a reassessment. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 73:1364-8.
- 8- U.S. Department of Health and Human Services Reproductive impairments among married couples. In: U.S. Vital and Health Statistics Series 23, No. 11. Hyattsville, MD, National Center for Health Statistics, 1982.
- 9- American College of Obstetricians and Gynecologists. Recommendations for Management of Recurrent Miscarriage. 2001. [http://www.acog.org/from\\_home/publications/press\\_releases/nr02-01-01-1.cfm](http://www.acog.org/from_home/publications/press_releases/nr02-01-01-1.cfm)
- 10- Neugebauer R, Kline J, Shrout P et al. Major depressive disorder in the 6 months after miscarriage. *J Am Med Assn* 1997; 277:383-8.
- 11- Friedman T, Gath D. The psychiatric consequences of spontaneous abortion. *Br J Psychiatry* 1989; 155:810-3.
- 12- Frost M, Condon JT. The psychological sequelae of miscarriage: a critical review of the literature. *Aust N Z J Psychiatry* 1996; 30:54-62.
- 13- Mutter GL, Pomponio RJ. Molecular diagnosis of sex chromosome aneuploidy using quantitative PCR *Nucleic Acids Res* 1991; 19:4203-7.
- 14- Mansfield ES. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms *Hum Mol Genet* 1993; 2:43-50.
- 15- Pena, SDJ, Jeffreys, AJ. Breve introdução às impressões digitais de DNA. *Rev Bras Genet* 1993; 15:857-79.
- 16- Pertl B, Weitgasser U, Kopp S, Kroiser PM, Sherlock J, Adinolfi M. Rapid detection of trisomies 21 and 18 and sexing by quantitative fluorescent PCR *Hum Genet* 1996; 98:55-9.
- 17- Pertl B, Yau SC, Sherlock J, Davies AF, Mathew CG, Adinolfi M. Rapid molecular method for prenatal detection of Down's syndrome. *Lancet* 1994; 343:1197-8.
- 18- Toth T, Findlay I, Papp C, Toth-Pal E, Marton T, Nagy B, Quirke P, Papp Z. Prenatal detection of trisomy 21 and 18