

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROF. *TUISKON DICK*
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Diagnóstico de anormalidades cromossômicas em fetos
com múltiplas malformações no HCPA:
Experiência com o uso exclusivo de cariótipo e avaliação
da contribuição da análise molecular

Tese de Doutorado

REJANE GUS KESSLER

Porto Alegre, maio de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROF. *TUISKON DICK*
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Diagnóstico de anormalidades cromossômicas em fetos com
múltiplas malformações no HCPA:
Experiência com o uso exclusivo de cariótipo e avaliação da
contribuição da análise molecular

REJANE GUS KESSLER

Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani
Co-orientadora: Dra. Sandra Leistner-Segal

Tese de Doutorado defendida como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Vera Maria Treis Trindade
(Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Profa. Dra. Mariluce Riegel
(Instituto de Genética Médica, Universidade de Zurich)

Dr. Sharbel Weidner Maluf
(Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre)

Porto Alegre, maio de 2009

Às minhas filhas, Bruna e Ariela, verdadeiras fontes de inspiração, e que são a razão de tudo...

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar minha lista de agradecimentos com meu caro Roberto Giugliani, não porque de praxe devemos fazê-lo ao Orientador, mas sim, porque foi ele quem primeiro acreditou em mim desde os meus primórdios aqui na Genética (há mais de 25 anos). Sempre me incentivou a crescer profissionalmente, e também como pessoa, me ajudando em momentos difíceis, sendo por diversas vezes mais “amigo” do que “chefe”. Certamente, se não fosse por ele, eu não estaria aqui, defendendo meu doutorado hoje. A sua sabedoria, liderança e competência serviram de exemplo para que eu pudesse construir minha caminhada, tornando-me uma profissional segura e confiante, e fazendo das minhas próprias conquistas uma batalha gratificante. A ele, minha eterna gratidão e admiração.

- À minha querida amiga, confidente e co-orientadora (nesta ordem), Sandra Segal, que não poupou esforços para que eu chegasse até aqui, sempre me incentivando, tentando me passar seus conhecimentos, extremamente prestativa e disponível, tanto na bancada como nas correções dos artigos e tese; incansável e paciente, a quem devo grande parte deste trabalho.

- À minha querida amiga e eterna incentivadora Maria Teresa Sanseverino, por suas constantes e sábias intervenções e sugestões, mas principalmente, por ser uma otimista incurável e ter sempre uma palavra de consolo na hora certa, uma verdadeira Madre Teresa de Calcutá.

- À minha amiga de “priscas eras” Mariluce Riegel, que bravamente atravessou os mares, conquistando os Alpes suíços, chegando até a Universidade de Zurich, e que me abriu as portas do seu laboratório para as análises de QF-PCR e MLPA, sem as quais este trabalho nunca teria se concretizado.

- À minha querida colega de sala, Fernanda Timm, por ser esta amiga tão leal, confidente de todas as horas, sempre pronta para ouvir e ajudar, deixando constantemente à disposição seu ombro consolador para repousar nas horas de desespero. Não poderia deixar de agradecer também, a sua paciência em me ajudar, e muito, com suas valiosas dicas na informática, tema que ela domina tão melhor do que eu.

- Às tão queridas e prestativas Ingrid, Lili Cossio, Patricia Prolla e Patricia Koehler por suas sugestões e por terem colocado à minha disposição o laboratório de Medicina Genômica.
- Aos bolsistas da Biologia Molecular do SGM Thaís, Ana, Marcela, Camila e Rafael por me receberem com tanto carinho e paciência no laboratório.
- Às “amigníficas” Cristina Netto e Maira Burin (Sandra e Teresa também “amigníficas”), por tantos momentos relaxantes nas nossas “happy hours” e/ou congressos, que tornaram muito mais leve este período tão pesado que todos nós passamos nesta etapa final de doutorado.
- Aos bolsistas do Laboratório de Cultura de Tecidos, por nunca se negarem a me emprestar reagentes ou materiais que por ventura faltassem para a rotina (fato muito comum); em especial ao Alexandre, por agüentar meu mau humor matinal (outro fato bastante comum).
- Ao colega e amigo Sharbel por dividir algumas angústias citogenéticas, e cobrir sempre minhas férias com tanta dedicação. E também a suas bolsistas, principalmente a Maiana Fahler, sempre prontas para ajudar e ceder o que estivesse ao seu alcance, como boas colegas e vizinhas.
- Aos meus “velhos” amigos e companheiros de “guerra” desde a antiga Unidade de Genética Médica: Julio, Têmis, Laura (agora chefe), Maria Luiza, Janice e Ricardo, por terem dado um colorido especial ao meu cotidiano durante tantos anos.
- Aos jovens companheiros da sala de cafezinho do atual SGM por tantos momentos descontraídos, em especial o Hugo, por se colocar à disposição caso necessitasse de sua ajuda e conhecimento para as análises de MLPA.
- À Jacira, Zeniara, Marilda, Cléia, Priscila e todo o pessoal da secretaria, pelo apoio técnico e alegria do convívio.
- Ao tão eficiente Célio, por não medir esforços para tentar conseguir tudo que estava ao seu alcance, mesmo o que não estava, sempre com muita dedicação e prestatividade.
- À professora Vera Maria Treis Trindade, por suas valiosas sugestões como relatora.

- Ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da UFRGS, por aceitar tantas solicitações minhas, oportunizando o término deste trabalho.

- Ao FIPE HCPA, que aprovou o projeto e deu o apoio financeiro necessário.

E finalmente àquelas pessoas, que não me ajudaram diretamente nem contribuíram cientificamente com o trabalho, mas são aquelas que realmente dão sentido à minha vida:

- Às minhas filhas Bruna e Ariela, que são a razão de tudo que faço, que dão o real valor para minhas conquistas, e a valiosa oportunidade de realizar-me como mãe, me possibilitando sentir um amor único, verdadeiro e incondicional.

- Aos meus pais, eternos incentivadores, os alicerces da minha vida, formadores da minha personalidade, exemplos a serem seguidos, que possuem a lucidez e a solidez que eu necessitava para concretizar meus sonhos.

- Ao meu irmão Miguel, que sempre foi um exemplo de profissional sério e competente, por suas sábias sugestões e por acreditar que eu poderia chegar lá (ou aqui), “mesmo sendo bióloga”.

- À minha irmã, não de sangue, mas de escolha, Anne Bryk, uma eterna “Pollyana”, que sempre tentou me mostrar que para tudo na vida existe um lado brilhante e positivo, mesmo no lado mais obscuro da lua.

- Ao Marcelo, pai das minhas filhas, que por muitos anos esteve ao meu lado, segurando “as pontas”, e as meninas também, e que continua uma pessoa muito especial, com a qual sei que sempre poderei contar.

- Ao meu querido Nestor, que esteve constantemente ao meu lado nestes últimos três anos, e muito me incentivou para chegar até aqui, acreditou em mim, me apoiou e me deu a força necessária para seguir adiante, mesmo quando a vontade era de desistir em momentos de fraqueza e desânimo. A sua constante dedicação, preocupação e carinho me fizeram descobrir um amor diferente...

A TODOS, O MEU ETERNO E INESQUECÍVEL

“MUITO OBRIGADA”!!!

RESUMO

Com o desenvolvimento da citogenética convencional, a partir da metade do século passado, houve um enorme crescimento no entendimento da etiologia das síndromes malformativas, sendo as anomalias cromossômicas reconhecidas como a causa genética mais freqüente dos defeitos congênitos. Assim sendo, a investigação de aberrações cromossômicas através do cariótipo se tornou uma rotina na investigação das malformações e de outras condições. Desde os anos 70, quando o diagnóstico pré-natal para a detecção de anomalias cromossômicas no feto foi estabelecido, este tem se tornado uma prática usual em muitos países, e uma importante ferramenta para o aconselhamento genético. A introdução da ultra-sonografia pré-natal na obstetrícia permitiu a identificação precoce de fetos com malformações, os quais têm grande probabilidade de serem portadores de alguma anormalidade cromossômica. O conhecimento da etiologia de sua doença é fundamental para diminuir a ansiedade da família e para tomada de decisões sobre a gestação em curso e sobre gestações futuras. Foi realizado um estudo retrospectivo de 18 anos (1989-2007) que teve como objetivos gerais: estimar a freqüência das anormalidades cromossômicas mais comuns através do cariótipo convencional e suas indicações para as gestantes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (artigo 1). Embora o cariótipo seja considerado o exame padrão ouro para este tipo de investigação, o mesmo possui algumas limitações. Entre elas se destaca a dependência de uma cultura de células, o que significa uma espera de 10 a 14 dias para se obter um resultado, tempo este precioso para a família e para a gestante. Além disto, corre-se o risco de perda da cultura por contaminação ou falta de crescimento celular, e com isso nenhum resultado é atingido, permanecendo a família sem um esclarecimento sobre a situação. Na tentativa de solucionar estes problemas, nesta tese, também foi proposta uma continuação do estudo (de 2006 a 2008) em fetos com múltiplas malformações, para testar a aplicação de técnicas moleculares, como QF-PCR e MLPA em diferentes materiais fetais (artigo 2). Ainda, quando a coleta de materiais tradicionais como líquido amniótico, ou biópsia de vilosidades coriônicas, eram impossíveis de se coletar por alguma dificuldade, incluindo os problemas morfológicos do feto, materiais alternativos, como urina, foram obtidos para se testar sua utilidade para se atingir o diagnóstico citogenético. Os achados citogenéticos relatados no artigo 1 foram compatíveis com os da literatura, sendo a trissomia do 21 a anormalidade cromossômica mais freqüentemente detectada no pré-natal. Entretanto, como o risco de recorrência desta síndrome foi zero neste estudo, um filho anterior com síndrome de Down foi considerado uma indicação fraca, sendo priorizadas para a realização do exame outras famílias carentes de maior risco. Por outro lado, com a técnica de MLPA (artigo 2) não foram obtidos resultados satisfatórios, provavelmente porque as amostras não permitiam obter DNA na qualidade necessária para esse procedimento. Com a técnica de QF-PCR pode-se obter 30 resultados (alguns parciais) nas 50 amostras coletadas. O estudo citogenético convencional de 13 amostras em que materiais diversos dos usuais foram empregados teve 100% de sucesso. Com a aplicação desse arsenal de técnicas, a chance de se obter uma informação citogenética ficou bem maior, diminuindo a ansiedade do casal e auxiliando nas suas decisões reprodutivas.

ABSTRACT

With the development of conventional cytogenetic techniques, since the second half of the last century, there was an enormous growth in knowledge of the etiology of malformed syndromes, being the chromosomal abnormalities considered the most common genetic causes of congenital defects. Therefore, the investigation of chromosomal aberrations by karyotype became a routine in the investigation of the malformations and many other conditions. Since the 70's, when prenatal diagnosis to detect chromosomal abnormalities in the fetus was set up, this became usual practice in many countries, and an important tool for genetic counseling. The introduction of the ultrasound in the obstetrician practice allowed the early identification of the malformed fetus, which has a great probability of being a carrier of some chromosomal aberration. The knowledge of the etiology of the disease is essential to reduce the anxiety of the family and to plan future pregnancies. From 1989 to 2007, 905 pregnant women from Hospital de Clinicas de Porto Alegre had an investigation for their fetus conditions by conventional karyotypes. With this information, a study was made which the main objectives were: to estimate the frequency of the most common chromosomal abnormalities and to estimate the most frequent indications that lead those women to make this invasive procedure (manuscript 1). Although the karyotype is considered the gold standard test for this type of research, it has some limitations, among them: the necessity of a cell culture, which means an expected time between 10 to 14 days to obtain the desired result, and time is a very precious aspect in pregnancy. Moreover, there is a risk of loss of culture because of contamination or lack of cell growth, leaving the family without a result. In an attempt to solve these problems, we proposed another study (from 2006 to 2008) to check the application of molecular techniques such as MLPA and QF-PCR in different malformed fetal materials (manuscript 2). Still, when the collection of traditional materials such as amniotic fluid, blood cord or chorionic villus biopsy were impossible to collect because of morphological problems on the malformed fetus, other alternative materials such as urine or intraperitoneal fluid were collected in an attempt to test these materials as a manner to reach the cytogenetic diagnosis. Our cytogenetics findings were similar to the literature, being trisomy 21 the most frequent chromosomal abnormalities. On the other hand, we did not find any recurrent case of this syndrome, so the indication for doing the exam, as having a previous child with Down syndrome, stayed as a weak indication that comes after others priorities, like pregnancies with greater risks. When we tried to introduce the MLPA technique, we did not achieve satisfactory results, probably because the samples were not suitable for good quality of DNA extraction. We then applied QF-PCR, and obtained 30 results (some partials) from 50 samples collected. The karyotype results of 13 samples from additional materials, not commonly used elsewhere, achieved 100% of success. With all these alternatives techniques, the chance to achieve a diagnosis was much higher, reducing the anxiety of the couple and helping the family to make decisions for futures pregnancies.

LISTA DE ABREVIATURAS

BVC- Biópsia de Vilosidades Coriônicas

EIM- Erros Inatos do Metabolismo

FISH- *Fluorescence In Situ Hybridization*

LA- Líquido Amniótico

MLPA- *Multiplex ligation-dependent probe amplification*

QF-PCR- *Quantitative Fluorescence Ploymerase Chain Reaction*

RAD - *Rapid Aneuploidy Diagnosis*

STR- *Small Tandem Repeats*

TN- *Translucência Nucal*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1

Punção de vilosidades coriônicas.....04

FIGURA 2

Cultura de amniócitos.....06

FIGURA 3

Eletroferograma de uma Trissomia do 21..... 11

FIGURA 4

QF-PCR do caso nº 2, trissomia do 13.....56

FIGURA 5

QF-PCR do caso nº 47, trissomia do 18.....57

FIGURA 6

QF-PCR do caso nº 52, trissomia do 18.....58

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	01
I.1. Histórico	02
I.2. Tipos de procedimentos invasivos.....	04
I.2.1. Amniocentese.....	04
I.2.2. Biópsia de Vilosidades Coriônicas.....	05
I.2.3. Cordocentese.....	06
I.2.4. Coleta de Material Fetal Alternativo.....	07
I.3. Cuidados Básicos com a Cultura de Células.....	07
I.4. Técnicas Moleculares Alternativas.....	09
I.4.1. FISH.....	09
I.4.2. QF-PCR.....	10
I.4.3. MLPA.....	12
I.5. Critérios para suspeitar de Aberrações Cromossômicas em fetos com múltiplas malformações.....	13
I.6. Justificativa	15
II. OBJETIVOS.....	16
II.1. Objetivos Gerais.....	17
II.2. Objetivos Específicos	17

III. RESULTADOS.....	18
III.1. Artigo 1	19
Artigo 1 em PDF.....	20
III.2. Artigo 2	25
Artigo 2 submetido para revista.....	26
IV. DISCUSSÃO	48
V. CONCLUSÕES.....	60
VI. REFERÊNCIAS.....	64
VII. ANEXOS.....	71
VII.1. Parecer do Comitê de Ética do HCPA.....	72
VII.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (pré-natal).....	73
VII.3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (pós-natal).....	74
VII.4. Confirmação da submissão do artigo 2.....	75
VII.5. Comentário do Editor	76

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

I.1. Histórico:

O começo da ciência chamada Citogenética Humana foi atribuído a Walther Flemming, um anatomista alemão, pioneiro na descrição da *cariocinese* ou *mitose* (1882) e considerado o fundador da ciência da *citogenética*, o estudo do material celular hereditário. Ele foi o primeiro a observar e descrever sistematicamente o comportamento dos cromossomos no núcleo celular, durante a mitose (Steven, 1999). Durante os anos seguintes, vários trabalhos foram publicados apresentando diferentes estimativas quanto ao número de cromossomos presentes na espécie humana. Um dos trabalhos de maior impacto foi o de Theophilus Schickel Painter, no início da década de 20, em células obtidas de testículos humanos, o qual descreveu que o número de cromossomos era 46 ou 48. Painter acabou decidindo a favor de 48 cromossomos, em sua última publicação (Painter, 1923). Mais de 30 anos se passaram até o descobrimento do verdadeiro número cromossômico humano, quando em 1956, Tjio e Levan aperfeiçoaram o método da colchicina e hipotonia, chegando finalmente aos reais 46 cromossomos. Inicia-se então, a era da citogenética clínica, principalmente depois que Lejeune e colaboradores (1959), estudando os cromossomos de fibroblastos de um paciente com Síndrome de Down, descobriram e descreveram a existência de um cromossomo extra, referindo-se pela primeira vez a uma *trissomia*, a trissomia do cromossomo 21. Desde os anos 50, com o desenvolvimento das técnicas da citogenética convencional, e principalmente com a introdução da técnica de bandeamento G (Drets e Shaw, 1971), houve um

enorme avanço no conhecimento das síndromes cromossômicas, a mais comum das causas das doenças genéticas (Pena, 1998).

A citogenética tornou-se então uma ferramenta fundamental para o diagnóstico clínico pré e pós-natal. De todos os recém-nascidos vivos, 2-3% podem apresentar alguma malformação congênita, e provavelmente, metade de todos os conceptos, humanos pode ter algum tipo de defeito cromossômico (Boué e Boué, 1973). Além disso, um em cada 200 nascidos vivos pode ter alguma anormalidade cromossômica, sendo estas responsáveis pela maior causa de retardo mental (Shaffer e Lupski, 2000). Isto reforça a idéia de que a análise citogenética tornou-se fundamental para a investigação destes casos nos últimos anos, demonstrando ser uma técnica indispensável para o manejo do diagnóstico pré-natal.

Desde a década de 70, o diagnóstico pré-natal para a detecção de anormalidades cromossômicas tem se tornado um procedimento rotineiro em muitos países desenvolvidos (Magalhães e Magalhães, 2001). Este procedimento invasivo tem sido amplamente reconhecido como um método confiável, com riscos aceitáveis para casais que possuem probabilidade elevada de gerarem uma criança com anormalidades cromossômicas significativas. Portanto, este procedimento tornou-se uma ferramenta fundamental para o aconselhamento genético, podendo evitar, tanto o nascimento, como a recorrência de crianças afetadas com estas doenças (Milunsky e Milunsky, 1998).

A análise cromossômica microscópica de células cultivadas (cariótipo), tem sido considerada uma técnica padrão ouro para o diagnóstico pré-natal, desde sua primeira aplicação, por Steele e Breg, em 1966. A coleta direta de material fetal

para a análise em laboratório permite a realização de diversos outros exames. Além do cariótipo fetal, a coleta permite a análise de ensaios enzimáticos para erros inatos do metabolismo (EIM) e análise molecular de diversas doenças gênicas. Atualmente, a obtenção do material fetal para qualquer uma destas análises, é realizada através de procedimentos invasivos, ou seja, através de uma punção transabdominal, realizada por um ginecologista ou radiologista experiente e guiada por ultra-sonografia (figura 1).

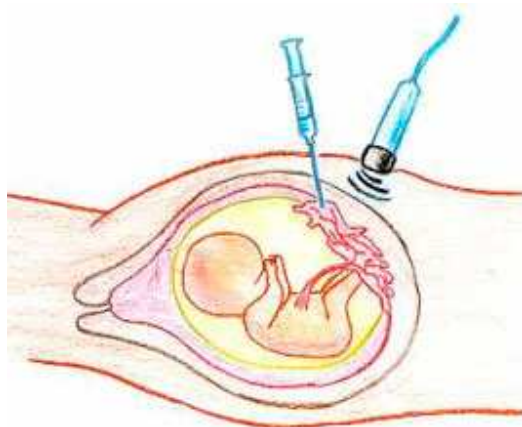


Figura 1. Punção de vilosidades coriônicas guiada por ultra-sonografia

Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=eureka

I.2. Tipos de Procedimentos Invasivos:

Os principais procedimentos invasivos realizados para obtenção de material fetal, cujo crescimento celular vai resultar na análise do cariótipo são:

I.2.1. Amniocentese:

A amniocentese é a coleta de aproximadamente 20ml de líquido amniótico (LA), no segundo trimestre, entre 15 e 16 semanas de gestação. Desde que a amniocentese foi introduzida em meados da década de 60, juntamente com a

análise citogenética, esta tem sido reconhecida como uma técnica muito segura e confiável para ajudar casais com risco de gerarem uma criança com anormalidade cromossômica clinicamente significativa (Caron et al., 1999).

I.2.2 Biópsia de Vilosidades Coriônicas (BVC):

Passados alguns anos, no início da década de 80, a Biópsia de Vilosidades Coriônicas (BVC) foi introduzida como uma alternativa bastante segura, porém mais precoce do que a amniocentese (Brambati et al. 1998; Jenkins e Wapner, 1999). A BVC, realizada entre 12 e 14 semanas de gestação, é também por via transabdominal com a coleta de 10 a 15mg de vilosidades da placenta, sendo que este material é o “espelho genético” do feto. As vilosidades, depois de limpas e dissecadas, podem ser analisadas diretamente e também após cultivo. Neste procedimento, o fator crítico é a limpeza do material, pois deve ser retirada minuciosamente toda decídua para ser descartada qualquer possibilidade de contaminação com células maternas.

Tanto as células do LA como as de BVC, depois de obtidas e lançadas em cultura, crescem aderidas na superfície de um frasco (figura 2), utilizado especificamente para este fim, e posteriormente coletado para a análise do cariótipo.

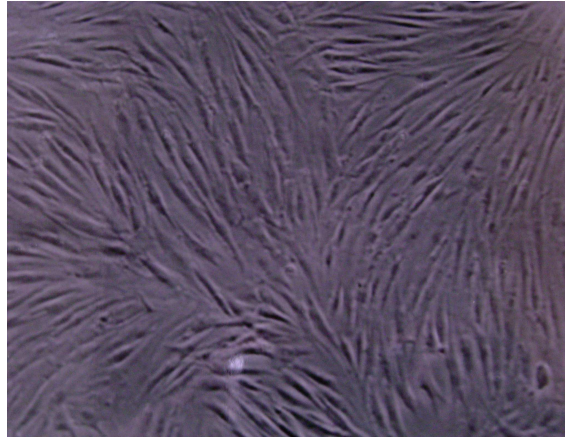


Figura 2. Cultura de amniócitos

Fonte: gentilmente cedido por Dra.Fernanda Timm (tese de doutorado)

Apesar de o cariótipo ter demonstrado ser um exame altamente confiável para o diagnóstico de anormalidades cromossômicas fetais, tanto numéricas como estruturais, estes procedimentos invasivos oferecem riscos para a gestação que variam nos diferentes centros, sendo que o mais tardio (amniocentese) oferece menor risco que o mais precoce (BVC), respectivamente em torno de 0.5% e 1%. A acuracidade do cariótipo fetal de células cultivadas do LA tem sido considerada entre 99.4%-99.8%, e do cariótipo da BVC está entre 97.5%-99.6% (Magalhães e Magalhães, 2001).

1.2.3. Cordocentese:

No início dos anos 80, com uma melhora na imagem da ultra-sonografia, o acesso ao sangue fetal ficou mais fácil, este podendo ser obtido através da punção de um vaso umbilical, na idade gestacional entre 18 a 20 semanas. Este procedimento, chamado cordocentese (Daffos et al., 1983), é utilizado na ausência de LA, ou quando se faz necessário o esclarecimento de um diagnóstico prévio

duvidoso. Entretanto, mesmo que a cultura de sangue permita um resultado de cariótipo em 72 horas, a idade gestacional já está bastante avançada e em muitos casos muito tarde para uma provável interrupção. Além disto, este procedimento está associado a um risco maior para complicações na gestação, portanto só deve ser utilizado em casos muito bem selecionados (Dugoff e Hobbins, 2002).

I.2.4. Coleta de Material Fetal Alternativo:

Em diversas situações, a coleta de LA, BVC ou cordocentese, torna-se impossível de ser realizada, devido a condição anatômica do feto (que muitas vezes possui líquido amniótico totalmente ausente). Mas exatamente por ele possuir múltiplas malformações, há necessidade de se obter o exame do cariótipo. Nestes casos, tenta-se realizar o exame em materiais alternativos, que muitas vezes são coletados como medidas terapêuticas (como drenagem cerebral em hidrocefalias), e cujo material é aproveitado para a realização do cariótipo. Estes possíveis materiais fetais alternativos podem ser: urina, fluidos intraperitoneal e cérebro-espinhal, fluidos de rins displásicos ou de higromas císticos. Esta prática não é muito usual na maioria dos laboratórios (Gole et al. 1997; Donnenfeld et al., 2001), porém foi utilizada no primeiro artigo desta tese com um sucesso de 100% (item III.1).

I.3. Cuidados básicos com a Cultura de Células

Apesar de o cariótipo ter permanecido como padrão ouro para detecção de aneuploidias, este método apresenta algumas limitações, sendo que a mais importante é a dependência do cultivo das células (Bui, 2007). Mesmo com o

advento de técnicas modernas, a falha no crescimento das células ainda é um grande obstáculo a ser vencido. O laboratório de cultura celular depende de vários fatores para obter sucesso no crescimento e obtenção de células viáveis. Os mais importantes estão listados a seguir:

a) a assepsia é um dos aspectos fundamentais a ser cuidado, e iniciando na coleta do material (o coletador, tanto obstetra como radiologista, deve ser muito bem treinado neste aspecto), e seguindo regras rigorosas no laboratório, como a lavagem constante das mãos com detergentes especiais, utilização de luvas, toucas, máscaras e propés. Um jaleco apropriado deve ser utilizado apenas dentro da sala de cultura.

b) utilização de material permanente (vidraria) estéril e descartável, sem a reutilização de nenhum material, evitando assim problemas com lavagem e/ou esterilização.

c) utilização de um meio de cultura apropriado para cada tipo de tecido. Obviamente, este deve ser estéril e dentro do prazo de validade.

d) os equipamentos devem ser mantidos constantemente limpos e sob manutenção. No caso das incubadoras, o ajuste da temperatura (37°C), umidade e quantidade de CO₂ (0,5%) deve ser permanentemente controlado. Mesmo com todos estes cuidados, infelizmente, algumas vezes, pode haver falha em algum destes itens acima citados, ocasionando a falta do resultado esperado pela família.

Outra importante limitação do cariótipo reside no fato das análises dependerem de uma pessoa muito experiente e bem treinada na observação ao microscópio. Ao contrário de muitas análises bioquímicas, esta não é uma análise

automatizada, e depende exclusivamente da capacidade do olho humano bem treinado (Pereira et al. 2000).

Como uma opção para o procedimento invasivo, surgiu um teste ultrasonográfico de rastreamento de risco gestacional para cromossomopatias (13,18,21), denominado Translucência Nucal (Nicolaidis et al., 1992). Mediante a medida do tecido subcutâneo da nuca do feto, entre 11-14 semanas de idade gestacional, pode-se selecionar pacientes para os exames invasivos. Se a medida for baixa, estas pacientes podem evitar a punção. Mas o resultado é emitido como uma probabilidade, e não como um teste diagnóstico (Magalhães, 2001).

I.4. Técnicas Moleculares Alternativas

I.4.1. FISH (*Fluorescence in situ hybridization*):

Apesar do cariótipo ser um exame de muita precisão, pesquisadores buscaram alternativas para suprir outra de suas grandes limitações: o tempo que a cultura de células leva para atingir o crescimento celular desejado (em torno de 10 a 14 dias) e conseqüentemente, a demora do resultado. Neste tipo de exame, a ansiedade da espera do resultado aumenta a cada dia que passa, principalmente se a gestante é informada de que seu filho tem alguma malformação. Nestes casos, a ansiedade é maior ainda, e a descoberta da etiologia da malformação é fundamental, tornando a questão “tempo” uma prioridade. O mais importante avanço nos últimos 20 anos foi o desenvolvimento da técnica citogenética molecular chamada de FISH (Klinger et al., 1992; Munnè et al., 1998). Através de uma hibridização do DNA alvo com sondas fluorescentes na própria lâmina, esta técnica pode detectar os principais cromossomos envolvidos em aneuploidias (13,

18, 21, X e Y), que representam 90% de todas estas anormalidades cromossômicas (Munnè et al., 1998). Isto pode ser realizado em até 48hs, e não depende da cultura de células, ou seja, esta hibridização pode ocorrer em núcleos interfásicos de LA ou BVC, conseqüentemente abreviando o resultado. No diagnóstico pré-natal, o FISH é bastante utilizado como uma resposta rápida e inicial das principais aneuploidias (triagem), necessitando a confirmação complementar através do cariótipo. O FISH em núcleos interfásicos é utilizado através de kits comercialmente disponíveis, e tem demonstrado, em múltiplos estudos, ser um método altamente sensível e específico para a detecção de aneuploidias (Shaffer e Bui, 2007). Obviamente a capacidade diagnóstica do FISH é limitada pelas sondas que são escolhidas; conseqüentemente anormalidades cromossômicas estruturais, aberrações cromossômicas numéricas incomuns, ou marcadores, não ficarão evidenciados, necessitando do cariótipo para detectar ou descartar estas raras, porém possíveis, alterações.

I.4.2. QF-PCR (*Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction*):

Esta outra técnica alternativa para o FISH foi primeiramente desenvolvida por Mansfield em 1993. Trata-se de um ensaio multiplex QF-PCR, que também permite a detecção um grande número de alterações numéricas cromossômicas em 24-48 horas. Seqüências cromossômicas repetidas e altamente polimórficas (*short tandem repeats*, ou STRs), que podem variar de comprimento entre os indivíduos, são amplificadas por PCR utilizando-se iniciadores (*primers*) que são marcados com fluorocromos. Os produtos da amplificação (*amplicons*) são separados por eletroforese em capilar, podendo ser visualizados e quantificados

utilizando-se um analisador automático com um software apropriado. Para cada sonda utilizada e informativa, dois picos serão produzidos com uma altura ou área na razão de 1:1, que representa um feto normal heterozigoto (dialélico normal). Amostras de fetos trissômicos irão demonstrar 3 picos na razão de 1:1:1 (trissômico trialélico), ou 2 picos na razão de 2:1 (trissômico dialélico)(figura 3). Se quatro ou mais marcadores polimórficos de STRs forem utilizados para cada cromossomo analisado, poucas amostras ficarão não informativas devido a homozigose em alguns loci (Pena, 1998).

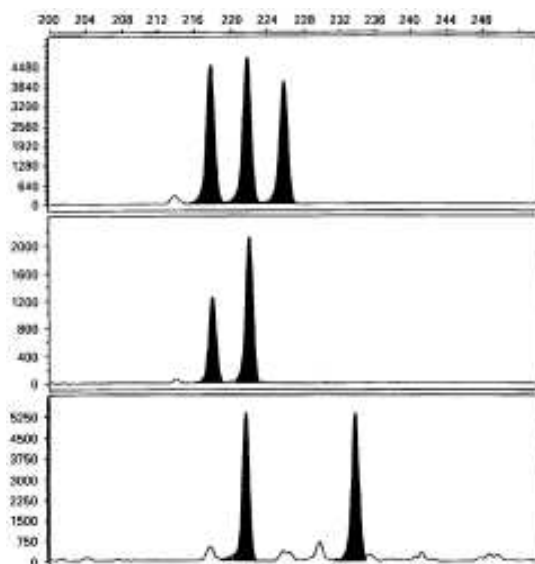


Figura 3. Eletroferograma da sonda D21S11 amplificada com dois tipos de trissomia 21. No painel superior, um eletroferograma com um padrão trialélico, na proporção 1:1:1. No meio, o painel mostra a trissomia do 21 com um padrão dialélico na proporção 2:1. No painel inferior, um feto normal, heterozigoto na proporção 1:1. (Fonte: Tóth, 1998)

Por mais de 10 anos, QF-PCR tem sido aplicado com confiabilidade e muito sucesso no diagnóstico pré-natal, tanto em LA como em BVC (Shaffer e Bui, 2007). Kits para QF-PCR estão comercialmente disponíveis e a sua acuracidade para não mosaicismo e aneuploidias comuns é similar ao FISH interfásico. QF-

PCR pode detectar 20-30% de mosaicismo (Donaghue et al., 2005) e é superior tanto ao FISH como ao cariótipo tradicional, no que diz respeito à detecção de contaminação materna (Stojilkovic-Mikic et al., 2005). A maior vantagem do QF-PCR sobre o FISH é seu custo-benefício, principalmente quando se processa um grande número de amostras. Conseqüentemente, esta tecnologia está substituindo o FISH na maioria dos laboratórios, principalmente na Europa. Entretanto, ambas as tecnologias têm a mesma limitação no que diz respeito a anomalias cromossômicas desbalanceadas e incomuns. Mas, como estas são relativamente raras e quase sempre associadas a malformações fetais graves, o médico poderá detectá-las através do ultra-som, e solicitar a busca de supostas aberrações cromossômicas incomuns através de um cariótipo tradicional.

1.4.3. MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*):

Outra técnica de citogenética molecular que tem sido muito utilizada recentemente é a MLPA, que é uma análise quantitativa baseada na PCR (Schouten et al., 2002). Possui muitas vantagens, como a alta eficiência, facilidade de operacionalizar, e necessidade de pequenas quantidades de DNA. Com apenas 20ng de DNA, e somente um par de iniciadores, esta nova tecnologia tanto é capaz de detectar um número anormal seqüências do DNA genômico, bem como uma mutação de ponto. Comparada com a reação controle, a área do pico de cada produto de amplificação reflete o número de cópias da seqüência alvo que está sendo analisada na amostra. Um número aberrante de cópias de uma ou mais seqüências detectadas por MLPA pode ser evidenciado por um aumento ou diminuição da área do pico do produto da amplificação das sondas destas

seqüências. Nesta técnica, as sondas é que são amplificadas adicionadas às amostras, e são capazes de discriminar seqüências que diferem em apenas um único nucleotídeo (Zhou e Ren, 2009). Os produtos gerados pela PCR são separados por eletroforese capilar adaptada em seqüenciador automatizado (normalmente o ABI 3130), e analisadas através de um software (Coffalyser V9.4). Tanto o termociclador como o seqüenciador são equipamentos fundamentais e estão presentes hoje em dia em quase todos os laboratórios de biologia molecular. Até 96 amostras podem ser analisadas simultaneamente, e os resultados podem ser obtidos em 24-48 horas. O kit SALSA MLPA P095 MCR-Holland, Amsterdam está comercialmente disponível e é específico para a detecção de aneuploidias. Este kit contém oito sondas independentes para cada cromossomo 13, 18, 21, e X mais quatro sondas específicas para o cromossomo Y, e é muito utilizado para a detecção rápida de aberrações numéricas destes cromossomos no diagnóstico pré-natal. Embora a aplicação da técnica de MLPA seja fácil, a implantação de um novo protocolo deste ensaio é muito complexa e demanda muito tempo para se conseguir determinar as condições ideais para a sua utilização. Os resultados dependem basicamente da qualidade da extração de DNA (Roeder, et al.2009).

I. 5. Critérios para suspeitar de Aberrações Cromossômicas em fetos com múltiplas malformações

Aberrações cromossômicas autossômicas são caracterizadas por quatro critérios básicos: retardo de crescimento intra-uterino e pós-natal; um padrão de sinais dismórficos, especialmente na face, genitália e membros distais; malformações (geralmente múltiplas); e retardo mental (Schinzel, 2001). Embora

nenhum dos quatro critérios seja obrigatório, a deficiência mental é a característica mais consistente, porém é a única que não pode ser detectada precocemente.

História familiar de rearranjos cromossômicos freqüentemente resulta em história de perda fetal, redução da fertilidade, baixo peso e/ou prematuridade do neonato com muitas malformações que vai a óbito logo depois do nascimento. Nestes casos, há fortes evidências de rearranjos desbalanceados no feto, cujo cariótipo se torna fundamental.

No quadro abaixo, listamos as malformações mais comuns em fetos que são prováveis portadores de aberrações cromossômicas, e que foram utilizados no trabalho como critérios para selecionar os casos suspeitos de cromossomopatias (Schinzel, 2001).

Malformações comuns em aberrações cromossômicas autossômicas

Pálato fendido, lábio fendido, ou ambos

Atresia de esôfago; fistula traqueoesofágica; atresia anal com fístula

Má rotação do intestino, mesentérico comum; onfalocele

Malformação do coração e grandes vasos

Malformação do rim e trato urinário

Alguma malformação cerebral, particularmente holoprosencefalia e agenesia do corpo caloso

Ausência ou hipoplasia do radio e polegar

Hexadactilia Postaxial

Microftalmia, coloboma ocular

Espinha bífida (ocipital ou lombar)

Fonte: Schinzel, 2001

I.6. Justificativa

Quando múltiplas malformações são detectadas por ultra-sonografia fetal, embora as possibilidades etiológicas sejam amplas, a probabilidade de uma anomalia cromossômica estar presente é muito alta. O cariótipo se torna fundamental nesses casos, mas nem sempre seu resultado é obtido. Algumas vezes esse insucesso decorre dos fatores técnicos já comentados, em outras, isso se dá porque o feto vai a óbito antes que uma investigação seja possível, não se chegando a nenhum diagnóstico pela indisponibilidade dos materiais necessários à análise. Em qualquer dos casos, é muito difícil oferecer um aconselhamento genético apropriado, e a família permanece sem nenhuma informação sobre a condição do feto ou sobre a probabilidade ter um outro filho com o mesmo problema. Como esta é uma situação muito difícil de manejar, na tentativa de encontrar uma alternativa para superá-la propusemos este estudo, buscando contribuir para diminuir a ansiedade destas famílias e facilitando o planejamento de futuras gestações baseado em informações precisas.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

II.1 - Objetivos Gerais

Este trabalho teve como objetivos gerais: estimar a frequência das anormalidades cromossômicas mais comuns e suas indicações no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, através do cariótipo convencional; e avaliar o uso de técnicas alternativas para ampliar a possibilidade de se obter uma informação citogenética pré-natal em fetos com múltiplas malformações de etiologia desconhecida.

II. 2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a contribuição das técnicas de citogenética molecular (MLPA ou QF-PCR), aplicadas em diferentes tecidos, para detectar possíveis aneuploidias dos cromossomos 13, 18, 21, X e Y em fetos com múltiplas malformações e sem diagnóstico;

2. Avaliar a utilidade da extração de DNA das células do LA que não aderiram no fundo do frasco de cultura para possível emprego em análises moleculares e assim permitir testes adicionais;

3. Avaliar a possibilidade de obter o cariótipo em materiais alternativos (urina, fluido do higroma cístico, fluido intraperitoneal, ou fluido cefalorraquidiano), o que seria útil quando se torna impossível a coleta dos tradicionais (LA, BVC, ou cordocentese);

4. Comparar as técnicas de citogenética molecular com a citogenética tradicional em relação à identificação da etiologia nos fetos com múltiplas malformações.

III. RESULTADOS

III. RESULTADOS

Os resultados desta tese estão organizados na forma de um artigo publicado e outro submetido à publicação.

III.1. Artigo 1

Prenatal Diagnosis for Fetal Chromosomal Abnormalities: report of 18-year experience in a Brazilian public hospital

Publicado na revista "Genetics and Molecular Biology", 2008; 31 (4): 829-833.



Prenatal diagnosis of fetal chromosomal abnormalities: Report of an 18-year experience in a Brazilian public hospital

Rejane G. Kessler, Maria Teresa V. Sanseverino, Sandra Leistner-Segal, José A.A. Magalhães
and Roberto Giugliani

Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract

The study of the fetal karyotype became an important tool for the fetal diagnosis of genetic diseases in the 1970s. Although application of this test has remained very restricted in Brazil, we had 905 referrals for prenatal fetal karyotyping between 1989 and 2007. In 879 cases, a fetal karyotype was obtained. We detected 74 abnormal karyotypes (8.4%), the majority being found when the prior indication was fetal malformation. When obtaining amniotic fluid or chorionic villus samples was difficult, alternative fetal materials (urine, cystic hygroma, cystic lung, interperitoneal and cerebrospinal fluids) were collected and we had success in obtaining karyotypes in all 13 cases. Although, the option of terminating abnormal pregnancies does not legally exist in Brazil, the information gained in assessing the prognosis of on-going pregnancies or estimating recurrence risks justifies prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. We conclude that, in keeping with the policy in most other countries, prenatal cytogenetic analysis is strongly recommended in high-risk pregnancies for fetal abnormalities. However, the unique aspect of this type of study is not its rarity in world terms, but its rarity in Brazil. This argues that Brazilian health policy on prenatal diagnosis requires reforming to make it much more widely available within the public health care sector.

Key words: prenatal diagnosis, chromosomal abnormalities, fetal malformations.

Received: January 31, 2008; Accepted: August 25, 2008.

Introduction

During the last decades the study of fetal karyotypes has become a very important tool for genetic counseling on recurrence risk and/or fetal chromosome diagnosis of at-risk pregnancies (Magalhães, 2001). Invasive prenatal diagnosis continues to be the standard method for searching for chromosomal aneuploidies or other genetic diseases (Bui, 2007). Prenatal diagnosis of cytogenetic abnormalities is now widely recognized as a reliable method with an acceptable risk for couples at high risk of giving birth to a child with clinically significant chromosome abnormalities (Caron *et al.*, 1999). Despite the fact that in Brazil amniocentesis and CVS were first introduced by Nazareth *et al.* (1981) and Gollop *et al.* (1988) respectively, there is still no public health care policy for application of cytogenetic prenatal diagnosis. As in other developing countries, this test is mostly confined to expensive private clinics, which means that it is rarely available for the great majority of pregnant women who depend on public medical services.

Nevertheless, we have been offering this test in our public hospital since 1989. Prenatal diagnosis is a very restricted test in Brazil, mainly because induced abortion, even indicated by fetal genetic disease, is not legally allowed. Despite this, we have had 905 referrals for fetal karyotyping since it was first offered by our clinic in 1989. In the first four years, we had an average of 80 cases/year and this number decreased in the following ten years to 45 cases/year. In the last four years this number decreased even further, to 35 cases/year. This will be discussed later.

Even with the development of modern techniques, cell culture failure remains one of the main obstacles to be overcome. In order to improve the chance of getting a karyotype result, alternative fetal samples, such as urine or cystic hygroma fluid were used for chromosome analysis when malformations were found in the fetus and availability of conventional tissues was limited. The purposes of this study were: 1) to describe the most frequent indications for karyotyping the fetus in our socio-economic conditions; 2) to estimate the frequency of the most common prenatal chromosome abnormalities in patients from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre; 3) to assess the cytogenetic results obtained with alternative tissue samples compared to amniocytes and chorionic villi.

Materials and Methods

Cytogenetic findings were retrospectively reviewed from 1989 to 2007 in 905 pregnant women, with a mean maternal age of 32.7 years, and mean gestational age of 22.7 weeks. Those women underwent prenatal cytogenetic evaluation only after a genetic counseling session, which means that risks, methods and indications were explained to the family. All samples were collected by a single gynecologist. The method used for sample collection was transabdominal puncture guided by ultrasound. Samples were obtained for all patients, even in cases of lack of amniotic fluid, when alternative fluids were collected. Amniotic fluid, or any other fetal sample collected, were cultivated in long-term cell cultures, with Amniomax medium, at 37 °C in CO₂ incubator. Cordocentesis followed the standard blood culture that means, short-term culture (72 h) at 37 °C, and no requirement for a CO₂ incubator. We used standard Giemsa-banding staining technique for all chromosome analyses.

Results

The most frequent indications for prenatal cytogenetic diagnosis were advanced maternal age (with an average of 39.9 years old and mean gestational age of 18.7 weeks), abnormal findings on fetal ultrasound, a previous child with chromosomal abnormalities, and increased nuchal translucency (Table 1). Despite advanced maternal age being the most frequent indication for prenatal diagnosis, the majority of aberrant karyotypes were found when

the indication was a fetal malformation detected by ultrasound. On the other hand, although the history of a previous child with Down syndrome was a relatively frequent indication, we did not find any positive cases in this group.

From the 905 prenatal cytogenetic analysis performed, we failed to obtain results in 26 (2.8%). Among the 879 karyotypes obtained, 74 (8.4%) were abnormal. (Table 1). Numerical abnormalities were found in 64 cases (7.3%), and structural aberrations in 10 cases (1.1%). The majority of numerical chromosomal abnormalities were autosomal trisomies. Trisomy 21 was the most frequent (28; 3.2%), and the second most frequent was trisomy 18 (24; 2.7%). Interestingly, trisomy 18 was almost entirely restricted to the group of “fetal abnormalities detected by ultrasound” and none was detected in the “increased nuchal translucency” group ($p < 0.001$). On the other hand, the difference in the frequencies of trisomy 21 between these two types of ultrasound prescreening was not statistically significant ($p = 0.096$). Trisomy 13 was found in six cases (0.7%), monosomy X in one (0.6%) and one case showed triploidy. Among structural chromosomal aberrations, translocations were the most frequent, and were detected in four out of the 879 cases analyzed (0.45%): reciprocal translocations in two cases and Robertsonian translocations in two others. Marker chromosomes were found in three cases, deletions in two cases and an inversion was present in one case.

In 13 cases alternative fluid samples were obtained (Table 2). The reasons for collecting alternative materials were lack of amniotic fluid in seven cases of kidney pathol-

Table 1 - Indications for invasive prenatal diagnosis and abnormal karyotypes.

Primary indication	Total number of cases (%)	Karyotypes obtained	Abnormal karyotypes (%)	Type of abnormalities (n)
Advanced maternal age	235(25.9)	227	13(5.7)	Trisomy 21 (10) Trisomy 18 (3)
Fetal malformation at ultrasound other than increased nuchal translucency	177(19.5)	169	38(22.5)	Trisomy 18 (19) Trisomy 21 (9) Trisomy 13 (4) 47,_,+mar (2) 45,X (1) Triploidy (1) 46,XX+13,der(13;14)(q10;q10) (1) 46,XY,del(18)(p?) (1)
Previous child with trisomy	125(13.8)	123	0	0
Increased nuchal translucency	65 (7.1)	63	9 (14.3)	Trisomy 21 (8) 47, XY,+mar(1)
Non immune Fetal hydrops	54 (5.9)	50	10 (20)	45,X (4) Trisomy 13(2) Trisomy 18(2) Trisomy 21(1) 46,XY,+14,der(14;21)(q10;q10)(1)
Others	249(27.5)	247	4 (1.6)	46,XX,+der(18)add(18)(p11)(1) 46,XX, t(15;16)(q21;p12)(1) 46,XX,inv(12)(q13q23)(1) 46,XY, t(7;10)(p21;q21)(1)
Total	905	879	74 (8.6%)	

Table 2 - Source of fetal material for karyotyping and success rate of cell cultures.

Fetus sample	Number of cases (n)	Culture success (n)	Success rate (%)	Gestational age in weeks (average)
Amniotic fluid	777	755	97.1	28.8
CVS	61	57	93.4	12.9
Cord blood	54	54	100	26.4
Alternative fluids ^a	13	13	100	31.2
Total	905	879	97.2	28.4

^aBladder (6), cystic hygroma (2), intraperitoneal (2), displastic kidney (1), cystic lung (1), cerebrospinal (1) fluids.

ogies, therapeutic drainage to facilitate delivery in six cases due to ascitis (n = 2), abdominal cyst (n = 2), pulmonary cyst (n = 1) and hydrocephaly (n = 1). The gestational age varied from 18th to 36th weeks with a mean age of 27.3 weeks. We had success in culturing these materials and in obtaining karyotypes in all cases (Table 2).

Discussion

Prenatal diagnosis has become a major aid to genetic counseling and for this, several important areas of technology have evolved, especially cytogenetic prenatal diagnosis, using analysis of cultured cells from the amniotic fluid at mid-trimester. Because of its high reliability and safety record with the lowest fetal loss and embryonic damage, amniocentesis has become the most common practice for prenatal diagnosis (Park *et al.*, 2001). However, CVS (chorionic villus sample) has gained popularity as a successful first trimester prenatal diagnostic technique since the mid 1980s (Brambati *et al.*, 1998), probably because of the advantage of establishing a diagnosis some weeks earlier in the pregnancy. Cordocentesis is a procedure used to obtain a sample from fetal blood directly from the umbilical cord in cases where amniocentesis is not possible or is used to give a quick result only in high-risk cases since procedure related pregnancy loss is high (Costa *et al.*, 1998).

Prenatal cytogenetic diagnosis using the above techniques was established in many countries, including Brazil (Gollop *et al.*, 1993; Pinto Jr, 2002), and has been performed for more than 18 years at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. During this period, the number of cytogenetic analyses has decreased by almost 50% per year in the Hospital and this can be explained by two facts: the introduction of nuchal translucency (NT) as a reliable screening method, and in the last four years medical insurance has provided payment for this exam, making it more accessible for the population. We would question whether NT alone is reliable to detect all forms of cytogenetic abnormality, since no cases of trisomy 18 were found in our NT sample (n = 65). On the other hand, when other forms of fetal abnormality detected by ultrasound were considered, then a frequency of trisomy 18 emerged which was even higher than trisomy 21 within this group. Intriguingly, our results suggest that prior diagnosis of fetal malformations using ultrasound is particularly efficacious for detecting trisomy 21

with the nuchal translucency test and, for trisomy 18, when other types of malformation are detected. However, Cheng *et al.* (2003) detected five cases of trisomy 18 among 171 instances of increased NT. This discrepancy might be due to our small size sample. Anyway, our results indicate that although ultrasound for nuchal translucency is strongly advised, any ultrasound prescreening should not be restricted to nuchal translucency, but should include also more generalized types of malformation, such as heart abnormalities, which are claimed to be present in almost all trisomy 18 fetuses. However, we feel that NT measurement used as a routine screening has decreased the number of referrals due to advanced maternal age, which has a low specificity, and has increased relatively the number of referrals for fetal abnormalities with a higher specificity. However, it has to be realized that tests such as nuchal translucency are not replacements for cytogenetic analysis, but provide strong indications for performing cytogenetic analysis in abnormal cases. The same arguments apply to serum screening in pregnant women. In some countries, such as the United Kingdom, increased maternal age is no longer applied as the sole referral indication for chromosome prenatal diagnosis; it is the combination of maternal age, serum screening and nuchal translucency and detection of other abnormalities by ultrasound which determines the validity of performing subsequent expensive cytogenetic analysis. However, all this is predicated on having all methods supported under the public health care system.

In a preliminary genetic counseling session, the approaches, methods and correct indications, are discussed with the family. In our sample, the history of a previous child with Down syndrome is the third more frequent indication. Although the risk of a recurrent trisomy is well established (Warburton *et al.*, 2004), the risk is low and, not surprisingly, we did not find any recurrent case. Considering the current economic limitations to offer prenatal tests in our country, we propose that higher priority for the indication of prenatal diagnosis should be given to pregnancies where a malformation is detected on ultrasound scan than for couples who had a previous Down child, unless Down syndrome was caused by a Robertsonian translocation carried by one of the parents. This latter also assumes that post natal cytogenetic screening of all Down patients and, where necessary, their parents has occurred

already to identify those families with a high recurrence risk due to one of the parents being a carrier of a translocation involving chromosome 21. It is such families that will derive the most benefit from prenatal diagnosis. With such a directed policy we, and other centers, would be able to provide more opportunity for poor families with higher risks for fetal abnormalities to be assisted by prenatal diagnosis within the public health care system in Brazil.

The results of fetal cytogenetic abnormalities in our study are similar to those reported in the literature (Caron *et al.*, 1999; Carothers *et al.*, 1999; Quintana *et al.*, 1999). Several studies have shown that Down syndrome is the most common and clinically significant cytogenetic abnormalities detected in prenatal cytogenetic studies (Mathews *et al.*, 1992; Carothers *et al.*, 1999), followed by Edwards Syndrome (Song *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2000). This was also found to be the case in our own series. The frequency of chromosomal abnormalities in the general population is estimated to be 0.5% of live births, but the frequency within the high-risk population is higher (around 5%, as observed in newborns with malformation by Nazer *et al.*, 2003, in Chile). The frequency of chromosomal abnormalities in our sample was even higher (8.5%) than other studies (Park *et al.*, 2001), probably because our Medical Genetic Service, as a reference center, receives patients who have been screened already by physicians in other Centers (without Genetic Services available) and are, therefore, more prone to having a chromosomal abnormality due to ultrasound alterations or familial history.

Karyotyping unconventional fetal samples, when it is difficult to obtain the traditional ones, is not a very common approach in most laboratories (Donnenfeld *et al.*, 2001; Gole *et al.*, 1997). We used this alternative when necessary and achieved a 100% success rate on an admittedly limited sample of 13 cases; however, the success rate is higher than that observed in other studies (Teoh *et al.*, 1996; Donnenfeld *et al.*, 2001).

Although, the option of terminating genetically abnormal pregnancies does not legally exist in Brazil, the information gained in assessing the prognosis of on-going pregnancies or estimating recurrence risks for future family planning justifies prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. In our sample the three most frequent indications were advanced maternal age, fetal malformation at ultrasound and a previous child with trisomy. However, the majority of aberrant karyotypes were found in the group with a fetal malformation detected by ultrasound and, as argued above, this opens up the possibility of triaging the initial referral group and being more efficient in deriving the maximum benefit to the maximum number of patients under limited resources.

Although, the benefit of using "alternative" fetal samples for karyotyping is marginal in terms of numbers this approach can provide a karyotype result to high-risk families in situations where it has proven impossible to derive

traditional tissues for analysis, even in advanced gestational age.

In general the analysis of our data supports the contention that the wide practice performed in many other countries of prenatal cytogenetic analysis being made available to the whole population and performed routinely in high-risk pregnancies, should also take place in Brazil within the public health care sector and not be almost entirely confined to the private care sector, as at present. However, a solid public health care policy for prenatal diagnosis needs to be established in which the distribution of facilities and reasonable coverage of expenditures has to be evaluated.

References

- Brambati B, Tului L, Cislighi C and Alberti E (1998) First 1000 chorionic villus samplings performed on singleton pregnancies by a single operator. *Prenat Diagn* 18:255-266.
- Bui TH (2007) Prenatal cytogenetic diagnosis: Gone FISHing, BAC soon. *Ultrasound Obstet Gynecol* 30:247-251.
- Caron L, Tihiy F and Dallaire L (1999) Frequencies of chromosomal abnormalities at amniocentesis: Over 20 years of cytogenetic analysis. *Am J Med Genet* 82:149-154.
- Carothers AD, Boyd E, Lowther G, Ellis PM, Couzin DA, Faed MJW and Robb A (1999) Trends in prenatal diagnosis of Down syndrome and other autosomal trisomies in Scotland 1990 to 1994, with associated cytogenetic and epidemiological findings. *Genet Epidemiol* 16:179-190.
- Cheng PJ, Liu CM, Chueh HY, Lin CM and Shoong YK (2003) First-trimester nuchal translucency measurement and echocardiography at 16 to 18 weeks of gestation in prenatal detection for trisomy 18. *Prenat Diagn* 23:248-251.
- Costa D, Borrell A, Soler A, Carrio A, Margarita E, Ballesta F, Puerto B, Caballin MR and Fortuny A (1998) Cytogenetic studies in fetal blood. *Fetal Diagn Ther* 13:169-175.
- Donnenfeld AE, Lockwood D and Lamb AN (2001) Prenatal diagnosis from cystic hygroma fluid: The value of fluorescence *in situ* hybridization. *Am J Obstet Gynecol* 185:1004-1008.
- Gole LA, Anandakumar C, Bongso A, Chua TM, Wong YC and Ratnam SS (1997) Analysis of cystic hygroma, ascitic and pleural fluids by conventional lymphocyte culture and fluorescent *in situ* hybridization. *Prenat Diagn* 17:1151-1157.
- Gollop TR, Eigier A, Naccache N, Bittencourt EA and Hauschild D (1988) Amostra de vilos corion por via transabdominal: Nota preliminar. *Femina* 16:767-768.
- Gollop TR, Naccache NF, Campos IMA and Pieri PC (1993) Amostra de vilos corion: 1290 casos / Chorionic villus sampling: 1290 cases. *Rev Bras Ginecol Obstet* 15:84-87.
- Han JR, Kim MY, Ahn HK, Cho JH, Ryu HM, Kim JM, Kim YM, Park SY, Han HK and Yang JH (2000) Comparison of the contribution rate of various prenatal screening methods for Down syndrome. *Korean J Obstet Gynecol* 43:1780-1785.
- Magalhães JAA (2001) Medicina fetal. In: Freitas F, Martins Costa SH, Ramos JGL and Magalhães JAA (Eds) *Rotinas em Obstetrícia*. 4th edition. ArtMed, Porto Alegre, pp 38-47.
- Mathews T, Navsaria D and Verma RS (1992) Prenatal diagnosis of 1,400 consecutive amniocentesis. *Gynecol Obstet Invest* 34:122-123.

- Nazareth HRS, Pinto Jr W and Andrade JAD (1981) Diagnóstico pré-natal de aberrações cromossômicas. Primeira experiência brasileira. *Rev Bras Genet* 3:459-470. (Abstract in English).
- Nazer J, Antolini M, Juárez ME, Cifuentes L, Hubner ME, Pardo A and Castillo S (2003) Prevalence of chromosomal aberrations at birth in the Clinical Hospital of Universidad de Chile, 1990-2001. *Rev Med Chil* 131:651-8.
- Park SY, Kim JW, Kim YM, Lee MH, Han JY, Kim YM, Yang JH and Ryu HM (2001) Frequencies of fetal chromosomal abnormalities at prenatal diagnosis: 10 years experiences in a single institution. *J Korean Med Sci* 16:290-293.
- Pinto Jr W (2002) Diagnóstico pré-natal. *Ciênc Saúde Coletiva* 7:139-157. (Abstract in English).
- Quintana JA, Quiñones OM, Méndez LA, Lavista MG, González CE and Hernández GP (1999) Resultados del diagnóstico prenatal cromosómico en Ciudad Habana. *Rev Cuba Obstet Ginecol* 25:153-158.
- Song HK, Ryu HM, Kim MY, Kim ES, Yoo SJ, Lee YH, Choi SK and Han HW (1997) Prenatal diagnosis of down syndrome. *Korean J Obstet Gynecol* 40:2826-2832.
- Teoh TG, Ryan G, Johnson J and Winsor EJ (1996) The role of fetal karyotyping from unconventional sources. *Am J Obstet Gynecol* 175:873-877.
- Warburton D, Dallaire L, Thangavelu M, Ross L, Levin B and Kline J (2004) Trisomy recurrence: A reconsideration based on North American data. *Am J Hum Genet* 75:376-385.

Associate Editor: Peter L. Pearson

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

III.2. Artigo 2

(submetido em 13/03/2009 ao *Journal of Biomedicine and Biotechnology*)

Molecular cytogenetics: the contribution of new techniques to the etiologic diagnosis in fetus with multiple malformations

Rejane Gus Kessler^{1,5}, Sandra Leistner-Segal¹, Maria Teresa Sanseverino¹, José Antônio de Azevedo Magalhães², Marcelle Cerski³, Patricia Barrios⁴ and Roberto Giugliani^{1,5}

¹Medical Genetics Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil

²Obstetrics and Gynecology Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil

³Pathology Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil

⁴Cardiology Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil

⁵Post-Graduation Program in Biological Sciences: Biochemistry; Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

Corresponding autor:

Rejane Gus Kessler
Medical Genetics Service
Hospital de Clinicas de Porto Alegre
Ramiro Barcelos, 2350
90035-903 - Porto Alegre - RS
Brazil

Tel + 55 51 21018011

Fax + 55 51 21018010

e-mail: rkessler@hcpa.ufrgs.br

Co-authors e-mails: ssegal@hcpa.ufrgs.br

msanseverino@hcpa.ufrgs.br

jmagalhaes@hcpa.ufrgs.br

mcerski@hcpa.ufrgs.br

pbarrios@hcpa.ufrgs.br

rgiugliani@hcpa.ufrgs.br

Running Title: Molecular cytogenetics in fetus with malformations

Abstract

Chromosomal anomalies are reported as the most common genetic condition in humans, indicating that cytogenetic analysis is fundamental for the investigation of malformation syndromes. Prenatal diagnosis, for detecting fetus chromosomal aberration, has become routinely applied. A fetus with multiple malformations has a great probability of having abnormal chromosomes. Although karyotyping has proved to be a highly reliable test, it has some limitations, mainly time consuming and culture failure. Trying to overcome these aspects, we propose to apply molecular techniques, such as MLPA and QF-PCR, in different fetus sources. The importance of this study remains in the alternatives we proposed to give a final diagnosis to a multiple malformation fetus. With these alternatives methods, we have more possibility to obtain cytogenetic information, which is very important for genetic counseling and reproductive decisions on the family.

INTRODUCTION

The development of conventional cytogenetic technique in the 50's led to a rapid increase on the knowledge about the etiology of malformation syndromes, being chromosomal anomalies reported as the most common genetic condition in human beings [1]. Around 2-3% of newborns may have congenital malformations, and from those, just 20% have an established etiology (genetic or environmental), being 80% of these multifactorial or unknown [2]. But this is only the tip of the iceberg, as probably half of the human concepts may have some kind of chromosomal defect [3], indicating that cytogenetic analysis is fundamental for the investigation of these cases. Since the 70's, prenatal diagnosis for detecting

cytogenetic abnormalities has become a routine procedure in many countries, and an important tool for the prevention of birth of handicapped children [4].

Cytogenetic analysis is an important component of invasive prenatal diagnosis as chromosomal abnormalities are detected in about 1 in 200 newborns and constitute a major cause of mental retardation and congenital malformations [5]. Microscopic chromosome analysis of cultured cells has been regarded as the gold standard method for prenatal diagnosis, since its first application to prenatal testing in 1966 by Steele and Breg [6] and the routine use of chromosome banding analysis in 1970s. Karyotyping has proved to be highly reliable for diagnosis of numerical chromosome abnormalities and structural rearrangements in fetal cells obtained invasively by either amniocentesis in the second trimester of pregnancy, or chorionic villus sampling (CVS) in the first trimester, since the early 1980s. The diagnostic accuracy of karyotyping fetal cells from cultured amniotic fluid (AF) has been found to be 99.4%-99.8%, and that of CVS 97.5-99.6%. However, the main limitation of karyotyping remains the requirement of a cell culture, resulting in a delay of 10-14 days [7]. Furthermore, the success of cell culture depends on many factors: very good laboratory conditions and tissue culture materials, technician's experience, satisfactory cell growth with good quality of metaphases. Unfortunately, due to a failure in one of the steps of this process some families may remain without karyotype results.

In the early 1980s, as better ultrasonographic imaging became available, the access to fetal blood became easier, as it could be obtained at about 18-20 weeks' gestation from umbilical cord (cordocentesis) [8]. Although blood sample allows rapid karyotyping within 72 hours, the gestational age at collection is already

advanced, and in positive cases it would be too late for interruption. Besides, this procedure is associated with higher risk of complications than other prenatal diagnostic and, hence, has been performed only in selected cases [9].

When a fetus with multiple malformations is detected by ultrasound, the list of possible etiologies is very large, but the possibility of a chromosomal anomaly is high. However, the result of a karyotype, so important on the evaluation, is not always achieved. In some cases this is caused by the factors explained above, in other cases, because the fetus dyes before any diagnostic investigation was started. In any case, it is very difficult to provide an appropriate genetic counseling without a karyotype, and the family stays with no information about the fetus condition nor about the risk for future pregnancies. This is a very hard situation, and trying to find an alternative to diminish the anxiety of those families, we proposed this study, which had the following objectives:

- 1) to assess the contribution of molecular cytogenetic techniques (MLPA or QF-PCR) in different tissues for detecting aneuploidies of chromosomes 13, 18, 21, X and Y in fetus with multiple malformations;

- 2) to assess the feasibility of extracting DNA from cells that did not adhere to the flask and were still floating on the medium, to avoid a potential loss of a cell culture of amniotic fluid;

3) to assess the feasibility of performing karyotype in alternative materials (urine, cystic hygroma fluid, intraperitoneal or cerebrospinal fluids) of the fetus, whenever it was impossible to obtain AF, CVS or blood;

4) to compare both molecular cytogenetic techniques with conventional cytogenetics regarding the identification of the etiology of multiple malformations;.

MATERIAL AND METHODS

For testing molecular techniques, we obtained different tissues from 50 multiple malformations fetus distributed as: umbilical cord (15), lung (7), amniocytes (14) and paraffin embedded tissues (14). For traditional karyotypes, we had 115 fetus, also with multiple malformations, and the materials tested were: AF, UC and alternative materials. The criteria for including the fetus as multiple malformations with indication for chromosomal aberrations were based on the “Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberration in Man” [10]. They are summarized in Table 1.

1. DNA extraction:

The DNA from fresh tissues was extracted as described by Miller et al [11] with slight modifications. Tissue specimens were grinded before addition of the nuclei lysis buffer and 1/10 of the reagent's volume used for blood extraction was used. In a few cases (n=8) a commercial kit was used for DNA extraction. (NucleoSpin®Tissue from Macherey-Nagel).

2. DNA extraction from paraffin embedded tissue:

This technique was adapted from Andreassen [12] and Coura [13] as following: Paraffin block was sliced in small pieces between 5-10 μ and 5 slices were placed into an ependorff. 1,5ml of Xylol was added and incubated for 30 minutes at 37°C. Tubes were centrifuged at 14.000 rpm for 3 minutes. The supernatant was removed and since the addition of Xylol all the steps were repeated once. After removing the last supernatant, samples were washed with 70% Ethanol and centrifuged for 3 minutes at 7.200 rpm. This step was repeated twice and samples were left at room temperature for at least 30 minutes. After completely removal of the paraffin, 300 μ l of Nuclei Lysis buffer, 20 μ l of SDS and 20 μ l of proteinase K were added. Samples were incubated for 3 days at 60°C and on the third day an extra volume of 5 μ l of proteinase K was added. The remaining steps for DNA precipitation were the same ones as described above for tissue DNA extraction.

3. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA):

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) is a semiquantitative analysis based on polymerase chain reaction (PCR). It possesses many advantages such as high efficiency, simple operation, low cost and has been widely applied in researches of diseases associated with copy number variation, point mutation and methylation [14].

This new multiplex method is able to detect abnormal copy numbers of genomic DNA sequences requiring a minimum of 20ng of human DNA[15]. In this technique, it is not the nucleic acid, but the probes added to the samples that are amplified. MLPA allows discrimination of sequences that differ only in a single nucleotide, therefore MLPA can be used for detection of known mutation. It is basically a method to make a nucleic acid sample suitable for multiplex polymerase chain reaction (PCR) with the use of only one pair of primers. In the currently available kits, the products generated by PCR are separated by sequence-type electrophoresis. The thermocycler and sequencing-type electrophoresis equipment that are required, are present in most DNA diagnostic laboratories. Up to 96 samples can be handled simultaneously, 45 DNA sequences, and results can be obtained within 24 hours. One of the currently MLPA kits (P095, MRC-Holland, Amsterdam) is commercially available and contains eight independent probes for each of the chromosomes involved in almost frequent aneuploidies: 13, 18, 21, and X, and four Y-specific probes; and it is used as a rapid prenatal test by several medical centers on a large scale [15]. MLPA profiles must be compared with a similar profile obtained from a control DNA sample. Compared with a control reaction, the relative peak area of each amplification product reflects the relative copy number of the target sequence of that probe in the analyzed sample. An aberrant copy number of one or more of the sequences detected by MLPA probes can therefore be detected by a decrease or increase in relative peak area of the amplification products of the probes detecting those sequences.

The length of the amplification product of each probe is different, and ranges in size between 130 and 480 nucleotides. This provides an optimal separation and

low background on sequencing type eletrophoresis gels. Although performing a MLPA reaction is easy, the development of new MLPA assays is complex and time-consuming, and the success of the results depends basically on the quality of the DNA extraction.

Briefly the protocol is:

Denature 20-500 ng of DNA by heating to 98°C in a thermocycler; add the MLPA probes and leave overnight at 60°C for hybridization; add the ligase and ligase buffer at 54°C for 15 min.(ligation of the two probe parts); inactivate the ligase by heating to 98°C; add PCR primers, dNTPs, and polymerase and start the PCR (amplification of probes); separation of amplification products by capillary sequencer (analyze the products by eletrophoresis).

4. Quantitative Fluorescent-Polymerase Chain Reaction (QF-PCR)

This method uses PCR amplification and fluorescent dye labelled primers target highly polymorphic regions of DNA sequence called short tandem repeats (STRs) that are located on the chromosomes of interest [16]. Each target marker is specific to the chromosome on which it is located, thus the copy number of the STR marker can be diagnostic of the copy number of the chromosome. Informative STR markers have been selected that exhibit a high heterogeneity so that copy number can be easily determined. A normal diploid sample has the normal complement of two of each of the somatic chromosomes, thus two alleles of a chromosome specific STR are determine by the QF-PCR technique as two peaks in a 1:1 ratio. The observation of an extra STR allele as either a three peak pattern

in a 1:1:1 ratio or two peak pattern in a 2:1 ratio is diagnostic of a presence of an additional sequence which in turn may represent an additional chromosome, as in the case of a trisomy.

Amplified products of the QF-PCR technique are analyzed quantitatively on a capillary Genetic Analyzer (ABI 3100) to determine the copy number of the analyzed STRs markers.

The kit used in the study was from ELUCIGENE. The ELUCIGENE QST*R™ range of products are DNA based multiplexed assays for the rapid prenatal determination of aneuploidy status for the three most common autosomal trisomies and the sex chromosomes X and Y. PCR products are observed as a 5 dye labelled system using filter set G5. Filter set G5 detects the 6-FAM (blue), VIC (green), NED (yellow) and PET (red) labelled fragments plus the Size Standard marker labelled with LIZ (orange) on an electrophoretogram in the Genotyper program. The markers used are described in Table 2 and 3.

5. PCR Set Up

PCR was performed according to the manufacturer's instruction as described briefly as following: the thermal cycler is programmed for a single step cycle to activate the DNA polymerase at 95°C, for 15 minutes, linked to an amplification cycling program of 30 seconds at 95°C (denaturation), 1 minute and 30 seconds at 59°C (annealing) and 1 minute and 30 seconds at 72°C (extension) for 26 cycles. This should be linked to a 30 minutes time-delay file at 72°C

(extension) on the final cycle; sufficient vials should be separated to pre-aliquoted QSTR reaction mix for a number of samples and controls to be run. The vials are centrifuged at 12,000g for 10 seconds; 2.5µl is added of test DNA to a sample vial containing QSTR reaction mix; the 95°C activation program is initiated (step 1). On completion of the amplification program the samples may be stored at room temperature overnight or at 2-8°C up to 7 days before analysis by capillary electrophoresis.

Optimal results can be obtained using an ABI 3100 Genetic Analyzer

We also obtained 115 samples from pregnant women with multiple malformations fetus, for traditional karyotype analysis. The materials obtained were: AF, UC and alternative materials, such as urine, cystic hygroma fluid, intraperitoneal or cerebrospinal fluids. AF and alternative materials were cultivated as long term culture, with Amniomax medium, at 37°C, in CO₂ incubator. The blood culture (UC) was processed as short term culture (72hs) following the standard procedure for this material.

RESULTS

We had 50 samples from different fetal materials for molecular techniques analysis, and 115 for traditional karyotyping (AF, UC, or alternative materials). All samples were from multiple malformations fetus with no diagnosis.

For the molecular techniques, we first tested all the samples with the MLPA kit P095. Obtaining genetic profiles from samples containing minimal amounts of

DNA can be difficult. Unfortunately, the quantity and quality of our DNA was not high enough: it was not possible to interpret the data we obtained (the peak areas tend to be too variable when the DNA quality is not good enough). We then ran all samples again using QF-PCR. The XY test is very sensitive so that even when the quality of the DNA was poor we could still determine the presence or absence of a Y chromosome. Thus, for some probands (08 cases), we could only give results for XY and not for the autosomes. At times it was not possible to say whether the proband was 45,X / 46,XX or 46,XY since insufficient probes amplified, and the peaks were very weak (cases number 20 and 24) (Table 4).

From the 50 cases, we could get partial results in 30. Although we had a very good technique for extracting DNA from paraffin (we've got enough DNA concentrations and relative good quality of DNA), this material showed to be inappropriate for molecular techniques, probably due to the formalin buffer used to embed the tissue at the time of collection. In all those cases we got no detectable peaks. In case number 2, the physician was quite sure about the clinical diagnosis of trisomy 13, and when the fetus died, lung was collected for culture and karyotyping, and also umbilical cord for posterior DNA analysis. The lung culture failure, but after three years we could try QF-PCR in DNA extracted from UC and confirmed the clinical indication. In this case, three peaks were detected with markers D13S252, D13S305, D13S634 and D13S325. For marker D13S628 we observed two peaks being one higher than the other indicating an extra allele.

In two cases, number 47 and 52, trisomy 18 was detected, confirming the previous karyotyping. In case number 47, three peaks were detected with marker D18S386 and D18S390, and two peaks, one being higher than the other, with

markers D18S535 and D18S391. In case number 52, three peaks were detected with marker D18S386, and two peaks detected, again one being higher than the other, with markers D18S391 and D18S978.

From the floating amniocytes that did not adhere to the flask, and were collected at the first medium change (14 cases), we succeeded in extracting DNA and performed QF-PCR. This material would be normally discharged. From those, we were able to obtain eight molecular results from which two did not have a previous successful karyotype (case number 4, and a partial result in case number 6).

The best results obtained for molecular analysis were from DNA extracted using a commercial kit (samples 47 to 54) as described before (Material and Methods).

From 6 cases of aneuploidies that had previous karyotype (31, 39, 47, 50, 51 and 52), we got only 2 confirmations (cases number 47 and 52). On the other hand, one case (number 2) that we did not get any karyotype result, we obtained a positive result through QF-PCR. Case number 53 could not be confirmed by molecular analysis because we did not know the origin of the extra chromosome marker, which did not hybridize with the probes used. Two previous normal karyotypes (cases number 48 and 54) were confirmed with QF-PCR. We had no discordant results between the molecular and traditional techniques.

In Table 5, we described the results from different sources of fetal material for karyotyping in 115 multiple malformations fetus. When, for some anatomical reason, AF CVS or UC could not be collected, the obstetrician tried other fetal material, sometimes for therapeutic reasons, such as bladder drainage, and those

materials were used also for karyotyping. Although they were few cases, we had 100% of culture success and karyotyping.

DISCUSSION

Cytogenetic analysis is an important tool for detecting chromosome abnormalities, once this is the cause of most common genetic disease in man [1]. It has been very useful for prenatal diagnosis, and also in clinical genetics. However the traditional technique has some limitations, and in order to overcome these problems some new molecular and rapid techniques have been developed, such as QF-PCR and MLPA. In our study, we tried to use all the resources we could to give diagnosis for a multiple malformations fetus that could evolve to death, or had already died without any information about his condition. The main limitation we wanted to overcome was to avoid the situation of leaving a multiple malformations fetus without a final diagnosis or karyotype. For genetic counseling and for the family this is very important information. So we tried to apply those molecular techniques in postmortem or paraffin-embedded fetal tissues, or even amniocytes that would be discharged.

Karyotyping unconventional fetal samples, when it is difficult to obtain the traditional ones, is not a very common approach in most laboratories [17,18]. Nevertheless, we used this alternative whenever necessary, and achieved 100% success rate on a limited sample of 13 cases [19], however this rate is much higher than other studies [17,20].

There is an ongoing debate whether Rapid Aneuploidy Diagnosis (RAD) should be employed as an adjunct to karyotyping or whether it could be used as a stand-alone test in selected groups of women [21,22]. The controversy is due to residual probability of a chromosome abnormality (both balanced and unbalanced) when RAD demonstrates a normal result. Few studies have estimated the residual risk of a clinically significant chromosome aberration for different indications when RAD results are normal. In a meta-analysis of 12 studies involving invasive tests, the risk of having a chromosome aberration that was not expected to be detected by RAD methods, was estimated to be 0.9%[23]. In our results, from 6 aneuploidies already diagnosed by karyotyping, only two cases (33.3%) were detected by QF-PCR, probably because of the poor quality of the DNA (mainly in paraffin). On the other hand, a third case detected by QF-PCR, waited for 3 years to receive a result (case number 2), once the tissue culture failure at the time of the karyotyping. Little is known about the patients' preference: whether QF-PCR alone or together with full karyotype, however in Sweden a research was made in 6000 women, and 70% chose QF-PCR analysis [7]. But, for sure, both techniques together are much more secure, once all molecular techniques have some limitations.

MLPA has the same inherent limitations as those of QF-PCR in that it will not detect most structural chromosome aberrations, or balanced rearrangements such as translocations and inversions. Moreover, maternal cell contamination and 69,XXX triploidy will not be diagnosed by MLPA [7]. In our study, for example, in case 53, a marker chromosome was detected by the traditional karyotype,

however, the molecular techniques were not able to detect it, because we did not know the origin of the marker, so no specific probe could be applied.

Although we developed a good protocol for extracting DNA from paraffin block wax, this material showed to be inappropriate for those molecular techniques, as demonstrated in other studies which also needed smaller fragments of DNA [24]. Another study in postmortem tissues embedded in paraffin succeeded to obtain longer amplifications fragments of around 300 bp using a specific treatment called pre-PCR restoration [25], thus achieving better results.

Whenever AF was usually set up, not all amniocytes adhered to the bottom of the flask. After few days, by the first medium change, we observed that there were still a considerable number of floating cells, which could be used to obtain a good amount of DNA. We proposed to extract DNA from those cells in order to guarantee a result independently to the cell culture, and also to abbreviate the result with molecular techniques. We developed this protocol, and although we did not succeed as expected, we could obtain results from two cases when cell culture had failure. We could probably improve the success of these analysis by extracting DNA with commercial kits rather than in-house techniques in order to obtain better quality DNA, which is essential for the molecular analysis used here. The need of more rapid testing methods which do not require cell culture has been recognized by the scientific community to improve pregnancy management and alleviate parental anxiety [26].

The best results obtained were from the last 8 cases, which the DNA was extracted using a commercial kit. This is a very important information and

corroborates the fact that high quality DNA is necessary, from which we can obtain results even with degraded DNA and background [27].

In conclusion, for follow up diagnostic testing, karyotyping has provided the gold standard method. This technology has remained essentially unchanged over 30 years, as no new technology has proven to be superior in terms of being able to detect such a wide range of abnormalities with the necessary precision [28]. Nevertheless, molecular testing, such as QF-PCR or MLPA, have their importance in terms of giving a rapid result, of being practical, and low costing.

The importance of this study remains in the alternatives we proposed to give a final diagnosis to a multiple malformation fetus. We suggested some ways to achieve a result and give to the family the information they need to rebuild their lives, and make plans for their future, with the help of more rapid and efficient technology (RAD) with an appropriate genetic counseling.

REFERENCES

- [1] S.D.J. Pena, "Molecular Cytogenetics II: PCR-based diagnosis of chromosomal deletions and microdeletion syndromes", *Genetics and Molecular Biology*, vol.21, no. 4, pp. 453-460, 1998.
- [2] R. Stevenson, and J.G. Hall, (2006) *Human Malformation and related Anomalies*, Oxford University Press, New York.
- [3] A. Boué, and J.Boué, "Evaluation des erreurs chromosomiques au moment de la conception", *Biomedicine*, vol. 18, pp.372-377, 1973.
- [4] A. Milunsky, and J. Milunsky, (1998) *Genetic Counseling: Preconception, Prenatal and Perinatal*, In: Milunsky, A. (Ed.) *Genetic Disorders and the Fetus. Diagnosis, Prevention and Treatment*, The Jonh Hopkins University Press, Boston. pp.1-52.
- [5] L.G. Shaffer, and J.R. Lupski, "Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans", *Annual Review of Genetics*, vol. 34, pp.297-329, 2000.
- [6] M.W. Steele, and W.R.J. Breg, "Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells", *Lancet*, vol. 19, no.1, pp.383-385, 1966.
- [7] T.H. Bui, "Prenatal cytogenetic diagnosis: gone FISHing, BAC soon", *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, vol. 30, pp.247-251, 2007.
- [8] F. Daffos, M. Capella-Pavlovsky, and F. Forestier, "A new procedure for fetal blood sampling in utero: preliminary results in fifty-three cases", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 146, pp. 985-987, 1983.
- [9] L. Dugoff, and J.C. Hobbins, "Invasive procedures to evaluate the fetus". *Clin Obstet Gynecol*, vol. 45, pp.1039-1053, 2002.
- [10] A. Schinzel, (2001) *Notes on Clinical Findings in Autosomal Chromosome Aberrations*, In: Schinzel, A. (Ed.) *Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man*, Walter de Gruyter Press, Berlin, New York, pp.28-34.
- [11] A.S. Miller, D.D. Dykes, and H.F. Polesky, "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells", *Nucleic Acids Research*, vol.16, no.3, pp.1215, 1988.
- [12] C.N. Andreassen, F.B. Sorensen, J. Overgaard, and J. Alsner, "Optimisation and validation of methods to access single nucleotide polymorphisms (SNPs) in Archival histological material", *Radiotherapy and Oncology*, vol. 72, pp.351-356, 2004.

- [13] R. Coura, J.C. Prolla, L. Meurer, and P. Ashton-Prolla, "An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue", *Journal of Clinical Pathology*, vol. 58, pp.894-895, 2005.
- [14] D. Zhou, and Z. Ren, "Multiplex ligation-dependent probe amplification and its application", *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, vol. 26, no. 1, pp. 45-49, 2009.
- [15] J.P. Schouten, C.J. McElgunn, R. Waaijer, D. Zwijnenburg, F. Diepvens, and G. Pals, "Relative quantification of 40 nuclei acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification", *Nucleic Acids Research*, vol. 30, pp. 57, 2002.
- [16] E.S. Mansfield, "Diagnosis of Down Syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms", *Human Molecular Genetics*, vol. 2, no.1, pp.43-50, 1993.
- [17] A.E. Donnenfeld, D. Lockwood, and A.N. Lamb, "Prenatal diagnosis from cystic hygroma fluid : The value of fluorescence *in situ* hybridization", *American Journal of Obstetrics and Gynecology* , vol.185 , pp.1004-1008, 2001.
- [18] L.A. Gole, C. Anandakumar, A. Bongso, T.M. Chua, Y.C. Wong and S.S. Ratnam,. "Analysis of cystic hygroma, ascitic and pleural fluids by conventional lymphocyte culture and fluorescent *in situ* hybridization", *Prenatal Diagnosis*, vol. 17, pp.1151-1157, 1997.
- [19] R.G. Kessler, M.T.V. Sanseverino, S. Leistner-Segal, J.A.A. Magalhães and R. Giugliani, "Prenatal diagnosis of fetal chromosomal abnormalities: Report of an 18-year experience in a Brazilian public hospital", *Genetics and Molecular Biology*, vol.31, no.4, pp.829-833, 2008.
- [20] T.G. Teoh, G. Ryan, J. Johnson, and E.J. Winsor, "The role of fetal karyotyping from unconventional sources", *American Journal of Obstetrics and Gynecology* , vol.175, pp. 873-877, 1996.
- [21] W.C. Leung, E.T. Lau, T.T. Lao, and M.H. Tang, "Can amnio-polymerase chain reaction alone replace conventional cytogenetic study for women with positive biochemical screening for fetal Down syndrome? " *Obstetric and Gynecology*, vol. 101, pp. 865-861, 2003.
- [22] V. Cirigliano , G. Voglino, A. Marongiu, M.P. Canadas, E. Ordonez, E. Lioveras, A. Plaja, C. Fuster, and M. Adinolfi, " Rapid prenatal diagnosis by QF-PCR:evaluation of 30,000 consecutive clinical samples and future applications", *Annual NY Academy of Science*, vol. 1075, pp. 288-298, 2006.

[23] W.C. Leung, and T.T Lao TT. ,“ Rapid aneuploidy testing, traditional karyotyping, or both?” *Lancet*, vol. 366, pp. 97-98, 2005.

[24] B. Halvarsson, A. Lindblom, E. Rambech, K. Lagerstedt, and M. Nilbert, “Microsatellite instability and/or immunostaining for diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer ? ” *Virchows Archiv* , vol. 444, pp. 134-141, 2004.

[25] S. Bonin, F. Petrera, B. Niccolini B, and G. Stanta, “PCR analysis in archival postmortem tissues”, *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology*, vol. 56, pp.184-186, 2003.

[26] U. Nicolini , F. Lalatta, F. Nattacci, C. Curcio, and T.H. Bui “The introduction of Q-F PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time of reconsideration ”, *Human Reproduction Update*, vol.10, pp. 541-548, 2004.

[27] A.D. Roeder, P. Elsmore, M. Greenhalgh ,and A. McDonald,“Maximization DNA profiling success from sub-optimal quantities of DNA: a staged approach ”, *Forensic Science International Genetics*, vol. 3, no.2, pp.128-137, 2009.

[28] H.R. Slater, D.L. Bruno, H. Ren, M. Pertile, J.P. Schouten, K.H.A Choo, “Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantity method (MLPA)”, *Journal of Medical Genetics* , vol. 40, pp.907-912, 2009.

Table 1. Malformations common in autosomal chromosomal aberrations

Cleft palate, cleft lip, or both
 Esophageal atresia, TE fistula; anal atresia with fistula
 Malrotation of the gut, common mesentery; omphalocele
 Malformation of the heart and the great vessels
 Malformation of the kidney and urinary tract
 Certain brain malformation, particularly holoprosencephaly and agenesis of corpus callosum
 Absence or hypoplasia of radius and thumb
 Postaxial hexadactyly
 Microphthalmia, ocular coloboma
 Spina bifida (occipital or lumbar)

Table 2. 13, 18 and 21 markers in ELUCIGENE QSTRs

Marker	Location	Observed Heterozygosity	Allele Size Range (bp)	Marker Dye Colour
D13S252	13q12.2	0.85	260-330	red
D13S305	13q13.3	0.75	418-470	green
D13S628	13q31.1	0.69	425-472	yellow
D13S634	13q21.33	0.81	355-440	blue
D13S325	13q14.11	0.86	235-320	green
D18S386	18q22.1	0.88	320-407	green
D18S390	18q22.3	0.75	345-400	yellow
D18S391	18q11.31	0.75	196-230	green
D18S535	18q12.3	0.92	450-500	Blue
D18S819	18q11.2	0.70	370-450	Red
D18S978	18q12.3	0.67	180-230	Yellow
D21S11	21q21.1	0.90	220-283	Blue
D21S1437	21q21.1	0.84	283-350	Blue
D21S1409	21q21.2	0.81	160-220	Red
D21S1411	21q22.3	0.93	256-345	Yellow
D21S1435	21q21.3	0.75	152-210	Blue

Table 3. X and Y markers in ELUCIGENE QSTRs

Marker	Location	Observed Heterozygosity	Allele Size Range (bp)	Marker Dye Colour
DXS981	Xq13.1	0.86	225-260	Blue
DXS1187	Xq26.2	0.72	122-170	Green
HPRT	Xq26.2	0.78	265-300	Green
DXS7423	Xq28	0.74	372-388	Green
DXYS267	Xq21.3/Yp11.2	0.87	240-280	Red
AMEL	Xp22.22/Yp11.2	-	104-110	Yellow
DXS6807	Xp22.32	0.70	331-351	Blue
DXS1283E	Xp22.31	0.89	292-340	Yellow
SRY	Yp11.31	-	244-251	Yellow
DYS448	Yq11.223	-	323-381	Red

Table 4. Results of 50 samples from different tissues analyzes by QF-PCR

Case number	Chr. 21	Chr. 18	Chr. 13	X / Y	Interpretation/comments	Traditional Karyotype	Fetal Material	DNA [ng/ul]
01	2	2	2	XX	No T13, 18, 21 detected		Lung	10
02	2	2	3	XY	Trisomy 13	-	UC	35
03	2	2	2	XY	No T13, 18, 21 detected		UC	40
04	2	2	2	XY	No T13, 18, 21 detected		Amnio	0.275
05	-	-	-	-	Not enough DNA		Amnio	5.37
06	-	-	-	XY	Very weak peaks		Amnio	10.7
07	-	-	-	XX	No DNA left		Paraff	34.5
08	2	2	2	XX	No T13, 18, 21 detected		UC	53
09	2	2	2	XY	No T13, 18, 21 detected		UC	54
10	2	2	2	XX	No T13, 18, 21 detected		UC	49.4
11	2	2	2	XY	No T13, 18, 21 detected		UC	49.1
12	2	2	2	XY	No T13, 18, 21 detected		Lung	45.4
13	-	-	-	XY	Very weak peaks		Lung	0.94
14	2	2	2	XX	No T13, 18, 21 detected		Lung	43.85
15	2	2	2	XY	No T13, 18, 21 detected		Lung	52
16	-	-	-	XX	Very weak peaks		UC	1.94
17	-	-	-	XX	Very weak peaks	46,XX	UC	49.5
18	2	2	2	XY	No T13, 18, 21 detected		Lung	60
19	2	2	2	XX	No T13, 18, 21 detected		UC	96.5
20	-	-	-	X/XX?	Very weak peaks		UC	15.2
21	2	2	2	XX	Very weak peaks		UC	27.1
22	-	-	-	XX	Very weak peaks		UC	0.26
23	-	-	-	-	No peaks		UC	0.61
24	-	-	-	XY?	Very weak peaks		UC	13.3
25	2	2	2	XX	Very weak peaks		Lung	2.45
26	-	-	-	-	No peaks		Paraff	11.4
28	-	-	-	-	No peaks		Amnio	42.6
29	-	-	-	-	No peaks	46,XX	Amnio	33.4
30	-	-	-	-	No peaks	46,XY	Amnio	19.5
31	-	-	-	-	No peaks	47,XX+21	Amnio	39.9
32	-	-	-	-	No peaks		Paraff	230
33	-	-	-	-	No peaks		Paraff	6.98
37	-	-	-	-	No peaks		Paraff	35.9
38	-	-	-	-	No peaks	46,XX	Paraff	10.6
39	-	-	-	-	No peaks	45,X	Paraff	6.47
40	-	-	-	-	No peaks	46,XY	Paraff	40.9
41	-	-	-	-	No peaks		Paraff	10.2
42	-	-	-	-	No peaks		Paraff	1.87
43	-	-	-	-	No peaks		Paraff	36.4
44	-	-	-	-	No peaks		Paraff	43.8
45	-	-	-	-	No peaks		Paraff	42.2
46	-	-	-	-	No peaks		Paraff	14.3
47	2	3	2	XY	Trisomy 18	47,XY,+18	Amnio	1.32
48	2	2	2	XX	No T13, 18, 21 detected	46,XX	Amnio	3.31
49	-	-	-	-	No peaks	46,XX	Amnio	4.19
50	-	-	-	XY	Very weak peaks	47,XY+21	Amnio	4.81
51	-	-	-	XY	Very weak peaks	47,XY,+18	Amnio	0.34
52	2	3	2	XY	Trisomy 18	47,XY,+18	Amnio	10.5
53	2	2	2	XX	No T13, 18, 21 detected	47,XX,+mar	Amnio	0.98
54	2	2	2	XX	No T13, 18, 21 detected	46,XX	UC	49.3

Legend: UC- Umbilical cord; Amnio-amnocytes; Paraff- paraffin

Obs. Cases number 27, 34,35 and 36 were not included in the study because the was not enough DNA

Table 5. Different materials from multiple malformations fetus and success rate of cell cultures

Fetus sample	Number of cases (n)	Culture success (n)	Success rate (%)
AF	87	83	95.5
UC	15	14	93.3
Alternative fluids ^a	13	13	100
TOTAL	115	110	95.6

^aBladder (6), cystic hygroma (2), intraperitoneal (2), displastic kidney (1), cystic lung (1), cerebrospinal (1) fluids.

IV. DISCUSSÃO

IV. DISCUSSÃO

A análise citogenética é uma ferramenta fundamental para a detecção de anormalidades cromossômicas, sendo esta a causa mais comum de doenças genéticas no homem (Pena, 1998). A citogenética tornou-se uma ferramenta crescentemente utilizada para o diagnóstico pré-natal, desde sua primeira aplicação por Steele e Breg em 1966. Atualmente o diagnóstico pré-natal de anormalidades cromossômicas é amplamente reconhecido como um método confiável para casais com risco alto de gerarem uma criança clinicamente afetada devido a aberrações cromossômicas (Caron e colaboradores, 1999). Os métodos tradicionais de coleta invasiva de LA, BVC ou cordocentese têm sido utilizados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre desde 1989, e 905 gestantes tiveram acesso a este tipo de exame em 18 anos, mesmo com as condições sócio-econômicas limitadas de um país em desenvolvimento. Entretanto, durante todo este período, o número de coletas vem diminuindo a cada ano, provavelmente devido à introdução de um eficiente método de triagem, a medida da Translucência Nucal (TN). Em uma sessão de aconselhamento genético, os métodos invasivos ou não, riscos e indicações são discutidos com a família. No nosso estudo, as três indicações de maior frequência para a realização do exame foram: idade materna avançada, malformação fetal detectada na ultra-sonografia e filho anterior com trissomia do 21, nesta ordem (Tabela 1, artigo1). Entretanto, a maioria dos cariótipos anormais foi encontrada no grupo cuja indicação era a detecção de malformações no feto através da ultra-sonografia, e devido a importância deste grupo é que nos dedicamos a ele na continuação deste estudo (artigo 2). Mesmo

sendo a terceira mais freqüente indicação do exame, casais que tiveram um filho prévio com síndrome de Down, não encontramos nenhum caso de recorrência. A recorrência para síndrome de Down é realmente baixa, conforme Warburton e colaboradores (2004), portanto não deve ser priorizada no nosso meio, onde as condições econômicas são limitadas, devendo-se oportunizar o exame para casais de maior risco. Os achados citogenéticos no nosso estudo foram similares aos da literatura (Caron et al., 1999; Carothers et al., 1999; Quintana et al., 1999), mostrando que a síndrome de Down é a mais comum e clinicamente significativa das anormalidades cromossômicas, seguida da síndrome de Edwards (trissomia do 18). A freqüência das anormalidades cromossômicas na população de risco é de 5% (Park et al., 2001), entretanto no nosso estudo esta freqüência chegou a 8,6%, provavelmente por ser o nosso serviço um centro de referência Nacional, para onde são drenados muitos casos de alto risco. Todos os resultados relativos às freqüências das anormalidades cromossômicas foram obtidos através da citogenética tradicional.

No entanto, a técnica tradicional tem algumas limitações, principalmente por depender do cultivo de células (Bui, 2007): o tempo de cultivo ao redor de duas semanas, que é extenso para uma paciente gestante, e a probabilidade de um insucesso no crescimento celular. No intuito de superar estes problemas, algumas técnicas moleculares de resposta rápida têm sido desenvolvidas, tais como QF-PCR e MLPA. Nos países desenvolvidos o custo do pessoal técnico é muito mais elevado do que o custo das técnicas moleculares automatizadas (Tóth et al. 1998), situação diferente da que ocorre em países como o Brasil, onde as despesas com mão de obra especializada em citogenética são menores do que as relacionadas

com a aquisição de sondas fluorescentes e outros insumos importados. Em nosso estudo procuramos utilizar todos os recursos que estavam ao nosso alcance para concluir o diagnóstico de um feto com múltiplas malformações e que poderia evoluir para o óbito sem qualquer informação sobre sua condição. O diagnóstico definitivo nesta situação é uma informação muito valiosa, e de extrema importância tanto para a definição do caso em si quanto para o aconselhamento genético. Para tanto, incluímos no nosso protocolo análises moleculares, que independem de cultivo celular e potencialmente permitiriam se chegar a um diagnóstico em algumas horas apenas. As técnicas moleculares que se mostraram mais adequadas à nossa amostra e às nossas necessidades e condições foram as técnicas de QF-PCR e MLPA. Ambas as técnicas são de resposta rápida (24 a 48 h) e podem detectar através de sondas e marcadores fluorescentes os cromossomos envolvidos nas mais frequentes aneuploidias (13, 18, 21, X e Y), que representam 90% das aberrações cromossômicas na espécie humana (Munné, 1998). A técnica de MLPA pode até detectar mosaicismos (porém apenas aqueles de altas frequências). Entretanto, nenhuma delas é capaz de detectar aberrações estruturais ou rearranjos balanceados (inversões ou translocações), tampouco triploidias (Bui, 2007). Devido a estas limitações, é ainda discutível a aplicação destas técnicas de detecção rápida de aneuploidias (conhecidas como RAD - *Rapid Aneuploidy Diagnosis*). Discute-se especialmente se elas poderiam ser aplicadas sozinhas, ou deveriam ser acompanhadas sempre da confirmação pelo cariótipo (Leung, et al. 2003; Cirigliano, et al. 2006). A controvérsia é devido a probabilidade residual de alguma aberração cromossômica existir mesmo quando RAD indicar um resultado normal, que na verdade seria um falso negativo,

uma vez que a técnica, em função das suas peculiaridades, deixa de detectar algumas alterações. Poucos estudos estimaram o risco residual para diferentes indicações quando RAD apresenta resultados normais. Em uma meta-análise de 12 estudos envolvendo testes invasivos, o risco de uma aberração cromossômica não ser detectada por RAD foi de 0,9% (Leung e Lao, 2005). Também pouco se sabe da preferência das pacientes, se preferem utilizar unicamente as técnicas moleculares rápidas, como QF-PCR ou MLPA, ou ter também o cariótipo completo. Num estudo realizado na Suécia em 6000 mulheres, 70% escolheram apenas fazer QF-PCR (Bui, 2007). Parece não haver dúvida de que as técnicas (citogenética tradicional e molecular) se complementam e, portanto, juntas podem oferecer melhores resultados (Leung et al., 2004).

Por exemplo, no caso 53 apresentado à Tabela 4 do nosso artigo 2, foi realizado cariótipo convencional e QF-PCR, mas apenas com o cariótipo foi possível detectar a presença de um cromossomo marcador, uma vez que a QF-PCR se restringe aos marcadores específicos dos 5 cromossomos de maior interesse. Esta Tabela 4 se refere apenas aos resultados de QF-PCR, pois a técnica de MLPA não gerou resultados possíveis de serem analisados, provavelmente porque a qualidade e/ou a quantidade de DNA era inadequada ou insuficiente. Esta técnica é muito sensível, e se o DNA contém impurezas, as áreas dos picos tendem a variar muito, não sendo possível se chegar a nenhuma conclusão. Isso limita a sua aplicação em amostras nas quais o material é escasso e com condições de conservação usualmente não ideais, como é o caso das amostras de material fetal, especialmente as não convencionais ou aquelas conservadas em parafina.

Nesta mesma Tabela 4, do mesmo artigo, pudemos observar os diferentes materiais fetais utilizados para extração e análise molecular de aneuploidias, totalizando 50 casos de fetos com múltiplas malformações e sem diagnóstico. O material fetal utilizado para extrair DNA e aplicar estas técnicas moleculares foi muito variado, desde tecido fetal fresco de necropsia como pulmão, ou cordão umbilical, até material fetal fixado em blocos de parafina. Também foi extraído DNA dos amniócitos (células fetais) que não ficaram aderidos ao fundo do frasco, e que seriam de qualquer maneira desprezados na primeira troca de meio de cultura. Do total de 50 amostras, obtivemos resultados em 30, sendo que em alguns destes, só foi possível detectar os cromossomos sexuais. Embora esta proporção de obtenção de resultados esteja abaixo da relatada em outros estudos, (Adinolfi, 2003 et al., Leung et al., 2004, Ogilvie et al., 2005), é compreensível uma vez que 13 dessas amostras (26%) eram de material fetal fixado em parafina (casos 26, e de 32 a 45). A técnica para extração de DNA dos blocos de parafina foi adaptada de Andreassen e colaboradores 2004, e testes já demonstraram que o material obtido muitas vezes não tinha qualidade adequada para amplificação. Provavelmente, variáveis pré-analíticas como processo de fixação, utilização de formalina não tamponada, temperatura e qualidade da parafina utilizada influenciam na pouca qualidade da extração, já que a qualidade do processamento e preparo das amostras parafinadas em todas as etapas até a inclusão em parafina é um ponto crítico para garantir o sucesso das análises (Halvarsson et al., 2004). É importante salientar que nesta técnica de QF-PCR, a qualidade do DNA é fundamental, podendo ser até mais determinante do que a quantidade. Este fato pode ser exemplificado pelos casos nº4 (46,XY) e 47 (trissomia 18), onde com

pequenas concentrações de DNA (0.275 e 1.32 ng/μl, respectivamente) foi possível se chegar a um resultado; enquanto que nos casos 28 e 29, apesar da grande concentração de DNA (42.6 e 33.4 ng/μl respectivamente), não foi possível obter nenhum resultado (Tabela 4, artigo 2).

Não obtivemos resultados em todas as nossas amostras, conforme seria de se esperar, mas o sucesso em alguns justificou a nossa abordagem. Um exemplo emblemático foi de um recém-nascido que faleceu logo após o nascimento e cujo cariótipo no sangue de cordão ficou inviabilizado pois a cultura dos linfócitos não teve sucesso, trazendo desalento adicional à família, que ficaria sem um diagnóstico. Uma alíquota do cordão umbilical do feto ficou congelada a -20°C, por 3 anos aguardando algum desenvolvimento técnico que permitisse sua análise. Incluído no presente estudo, conseguimos extrair DNA da amostra e aplicar a técnica de QF-PCR, com a qual obtivemos o resultado de trissomia 13, o que permitiu esclarecer o caso e orientar a família (caso 2, Figura 4). Nos poucos casos em que houve material suficiente para poder comparar a citogenética convencional com a molecular (QF-PCR), eles foram concordantes, como por exemplo, nos dois casos de trissomia 18 (casos 47 e 52; Figuras 5 e 6 respectivamente). Não houve nenhum caso discordante, e mesmo quando os picos eram fracos no QF-PCR, foi possível determinar os cromossomos sexuais (resultado parcial). Tóth e colaboradores (1998) encontraram concordância em todos os casos de diagnóstico pré-natal nas 212 mulheres grávidas testadas, quando compararam a citogenética tradicional com a técnica de QF-PCR. Schmidt e colaboradores (2000) encontraram, também, uma excelente concordância entre a citogenética tradicional e a molecular, quando examinaram o LA de 662

gestantes, com apenas um caso não informativo. Cabe aqui salientar que ele utilizou apenas dois a três marcadores STRs. Na nossa amostra, para cada cromossomo em análise foram utilizados 5 a 6 marcadores, diminuindo a probabilidade de homozigose, situação esta que torna o resultado não informativo. Segundo Pena (1998), se quatro ou mais marcadores polimórficos de STRs forem utilizados para cada cromossomo analisado, poucas amostras ficarão não informativas devido à homozigose em alguns *loci*.

Ainda como uma outra tentativa de diminuir o tempo de resposta, garantindo um resultado citogenético pré-natal, e não dependendo unicamente das células que estão em cultivo (que podem não crescer, ou até contaminar), estabelecemos um protocolo inovador para aproveitar os amniócitos que flutuam no meio de cultura e que ainda não aderiram ao fundo do frasco na primeira troca de meio (4-5 dias depois do lançamento da cultura). Estabelecemos um protocolo de aproveitamento destas células que seriam descartadas, juntando-as em um tubo cônico e extraíndo das mesmas o DNA, para posteriormente aplicar a técnica de QF-PCR. Obtivemos sucesso com esta estratégia, uma vez que dos 14 casos de amniócitos aproveitados para extração de DNA apenas seis casos ficaram sem diagnóstico. E dentre os 8 casos nos quais obtivemos resultados com essa técnica, dois deles (casos 4 e 6) estavam sem diagnóstico citogenético devido à falha na cultura. Os melhores resultados foram obtidos quando a extração de DNA foi realizada com kits comercialmente disponíveis (casos 47, 48, 52, 53, 54). Huang e colaboradores (2008) isolando células fetais da circulação materna também compararam as duas técnicas de extração de DNA (*in house* X *kits*) e

conseguiram melhores resultados com os kits, tanto na quantidade como na qualidade dos DNAs.

Figura 4. QF-PCR do caso nº2, trissomia do 13.

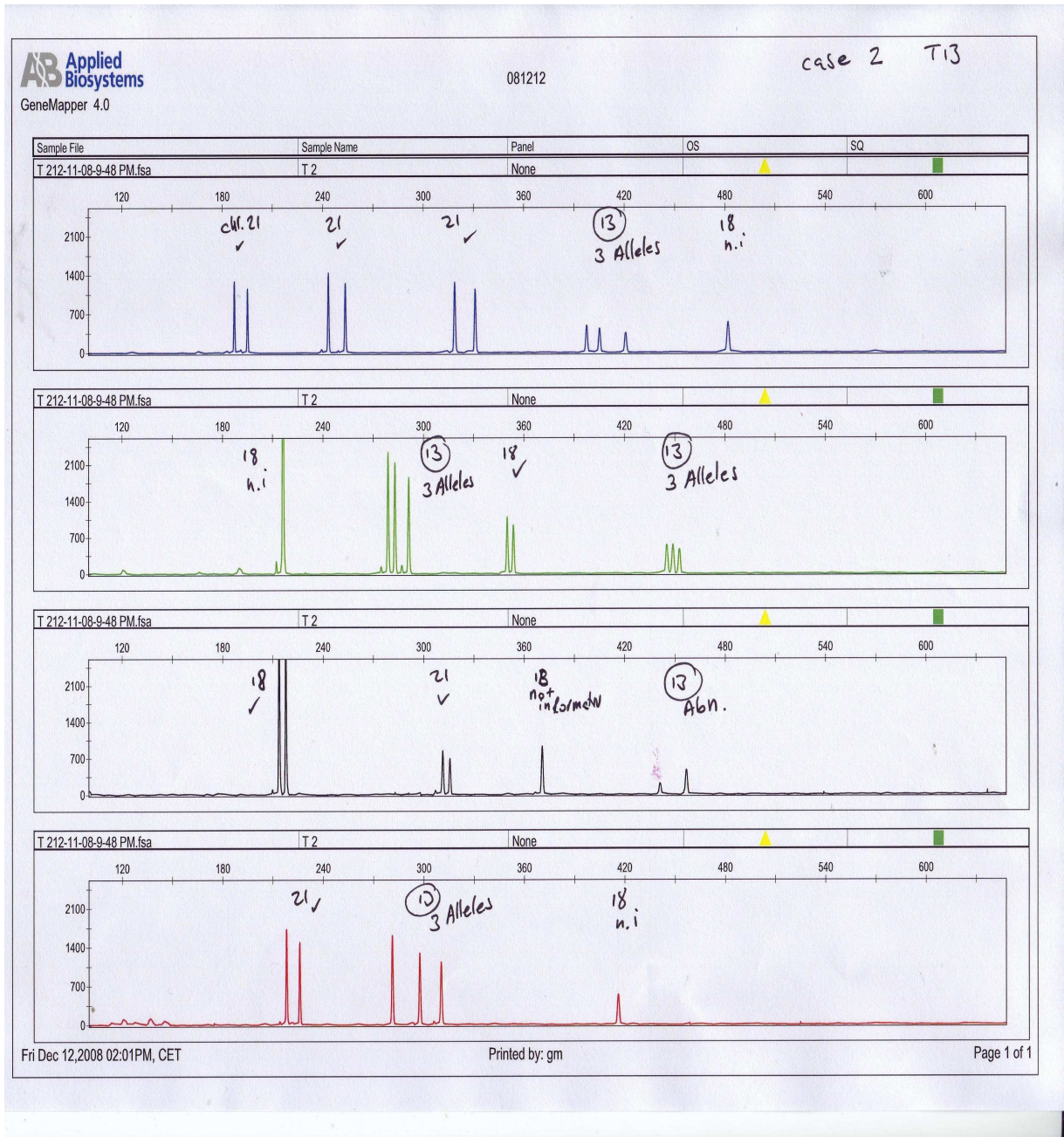


Figura 5. QF-PCR do caso nº 47, trissomia do 18.

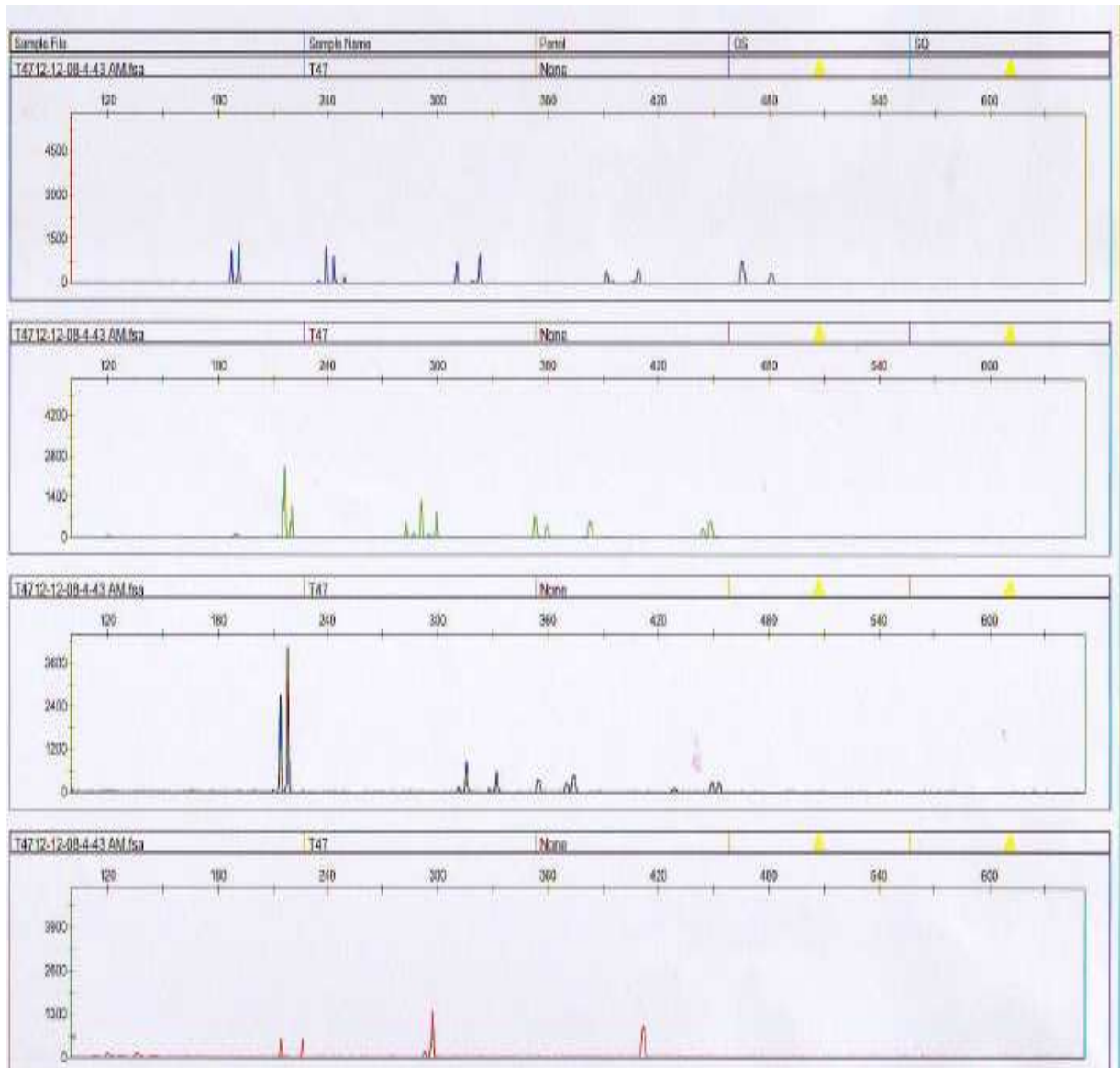
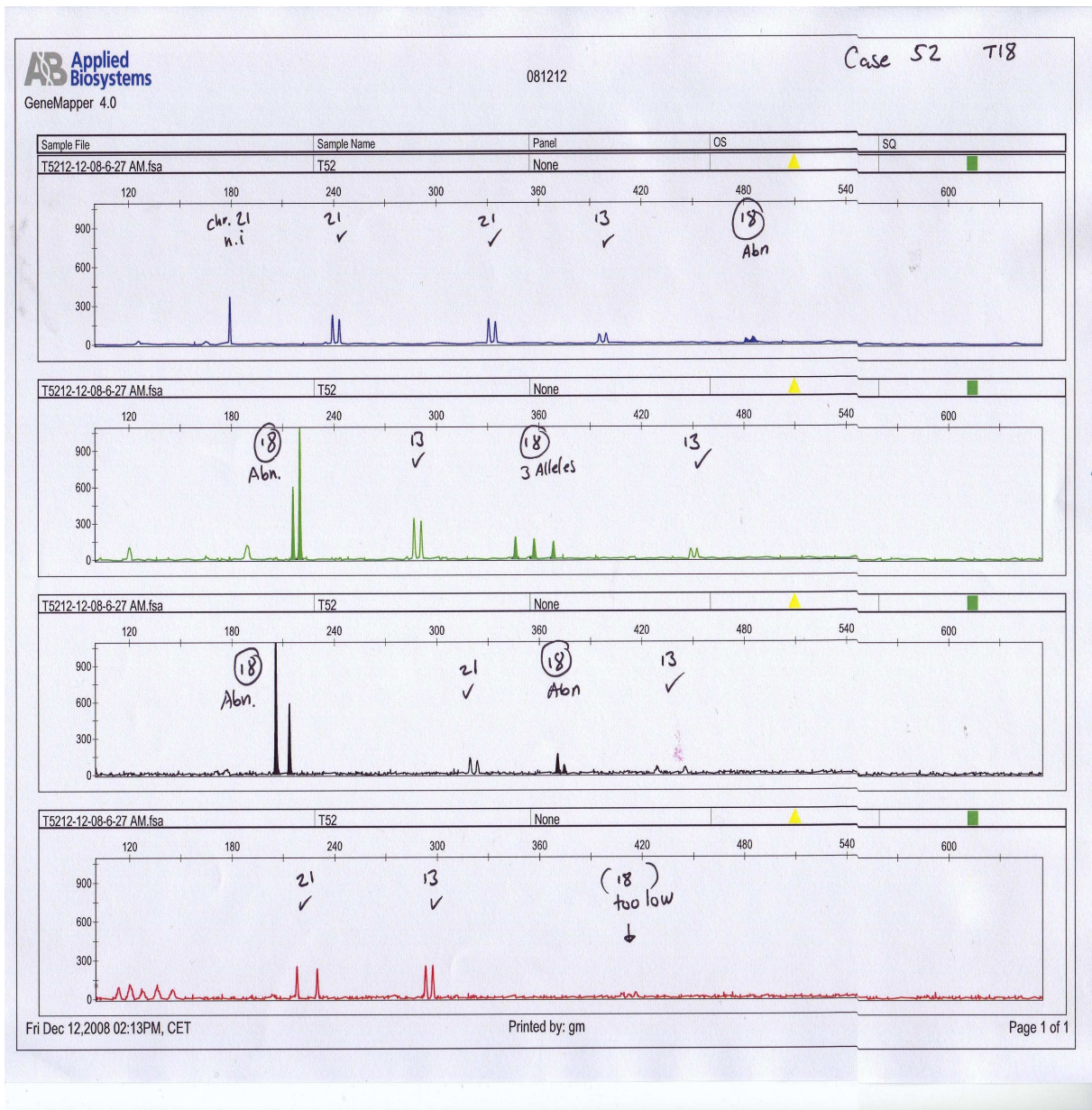


Figura 6. QF-PCR do caso n°52, trissomia do 18.



Como mais uma opção para garantir uma informação sobre a constituição cromossômica em um feto com múltiplas malformações, utilizamos materiais alternativos, outros que não os tradicionais (LA, BVC ou sangue de cordão), quando estes eram impossíveis de se coletar devido às malformações fetais e gestações complicadas, especialmente em casos de higromas císticos ou hidropsia fetal. Estes materiais fetais eram usualmente coletados para fins terapêuticos, como por exemplo, em casos de drenagem do fluido cerebral (hidrocefalias) para diminuir o volume cerebral na tentativa de parto por via baixa. Também a urina era utilizada quando havia necessidade de esvaziamento da bexiga nos casos de rins displásicos. Uma vez coletados, estes fluidos eram aproveitados para a tentativa de cultivo celular e posterior análise do cariótipo. Em todos os materiais alternativos coletados (n=13) foi obtido com sucesso o cariótipo convencional (Tabela 5, do artigo 2). Esta não é uma prática comum na maioria dos laboratórios (Gole et al. 1997; Donnenfeld et al., 2001), porém a utilizamos como um recurso adicional e obtivemos 100% de sucesso na cultura e análise do cariótipo (Tabela 2, artigo 1), porcentagem esta superior a observada em outros estudos. Donnenfeld e colaboradores (2001) atingiram apenas 76% de sucesso na análise citogenética de 72 amostras de fluidos de higroma cístico, enquanto Teoh e colaboradores (1996) conseguiram 87% de sucesso nas análises citogenéticas de 39 amostras de urina, fluido pleural, ascite pericárdica e fluidos de higroma cístico. Gole e colaboradores (1997) realizaram o cariótipo tradicional em 14 amostras de fluidos de higroma cístico, pleural e ascite, e obtiveram 85% de sucesso.

V. CONCLUSÕES

V. CONCLUSÕES:

Esta tese permitiu diversas conclusões:

- Os nossos achados citogenéticos são muito similares aos da literatura, sendo a trissomia 21 a mais freqüente das anormalidades cromossômicas, seguida da trissomia do 18 (Síndrome de Edwards). A freqüência de todas as anormalidades cromossômicas no nosso meio (8,6%) é ainda maior do que a esperada na população de alto risco (5%), provavelmente por ser o Serviço de Genética Médica um Centro de Referência Nacional.

- Um filho anterior com Síndrome de Down passou a ser considerada uma indicação de menor peso, uma vez que não encontramos nenhum caso de recorrência. Portanto, outras indicações de maior gravidade devem ser priorizadas numa população carente e de alto risco.

- O número de análises citogenéticas diminuiu quase 50% ao ano, basicamente com a introdução da medida da Translucência Nucal (TN). Entretanto, este é um teste de triagem e não diagnóstico, portanto não pode substituir o cariótipo.

- Os fetos com múltiplas malformações podem ter seu diagnóstico citogenético garantido através da aplicação simultânea de várias técnicas. As técnicas de MLPA ou QF-PCR podem ser aplicadas com sucesso em diferentes

tecidos fetais, como uma alternativa para uma resposta rápida, sem ter que depender de uma cultura de células, que pode falhar por vários motivos, não fornecendo o resultado esperado.

- É possível extrair DNA de amniócitos que ainda estão flutuando no meio de cultura e que seriam descartados na primeira troca de meio. Esta alternativa diminui em muito o tempo de espera pela cultura de líquido amniótico e evita a perda de um diagnóstico por contaminação das células ou falta de crescimento das mesmas.

- A utilização de amostras de fluidos alternativos do feto para a realização do cariótipo é uma opção a ser considerada, quando o líquido amniótico ou sangue de cordão umbilical são difíceis de serem obtidos. Em casos bem selecionados, esta prática pode evitar o risco adicional de se realizar um outro procedimento invasivo apenas para a obtenção do cariótipo.

- O sucesso na extração de DNA de blocos de parafina parece depender de um processo controlado de fixação do tecido, incluindo o uso de reagentes de alta qualidade. Para garantir o sucesso das análises moleculares, também é fundamental que o DNA seja extraído de forma integral (sem fragmentação) e com uma quantidade razoável.

- Para que se obtenha um resultado satisfatório nas técnicas moleculares, especialmente MLPA, é fundamental que o processo de extração de DNA seja

realizado da melhor forma possível, sendo que a utilização de kits comerciais teve melhor desempenho que a técnica usual *in house*.

- Embora QF-PCR seja uma técnica bem estabelecida e preencha os requisitos de uma metodologia de resposta rápida tão importante no diagnóstico pré-natal, ela é limitada a apenas alguns cromossomos. Isso, aliado a uma pequena taxa de insucesso, indica que ela não pode ainda substituir totalmente as técnicas de citogenética tradicional.

- A utilização simultânea de diferentes técnicas (convencionais e moleculares) e diferentes tecidos (tradicionais e alternativos) pode ser decisiva para que, pelo menos em alguns casos, um diagnóstico citogenético seja alcançado, permitindo o esclarecimento do caso e o aconselhamento genético.

VI. REFERÊNCIAS

VI. REFERÊNCIAS

Adinolfi M, Sherlock J, Cirigliano V, Pertl B. Prenatal screening for aneuploidies by Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction. *Comm Genet*, 2003; 3:50-60.

Andreassen CN, Sorensen FB, Overgaard J, Alsner J. Optimisation and validation of methods to access single nucleotide polymorphisms (SNPs) in Archival histological material. *Radiother and Oncol*, 2004; 72:351-356.

Brambati B, Tului L, Cislighi C, Albertti E. First 10000 chorionic villus samplings performed on singleton pregnancies by a single operator. *Prenat Diagn*, 1998; 18: 255-266.

Boué A, Boué, J. Evaluation des erreurs chromosomiques au moment de la conception. *Biomedicine*, 1973; 18:372-377.

Bui TH. Prenatal cytogenetic diagnosis: gone FISHing, BAC soon. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2007; 30:247-251.

Caron L, Tihy F, Dallaire L. Frequencies of chromosomal abnormalities at amniocentesis : over 20 years of cytogenetic analysis. *Am J Med Genet*, 1999 ; 82 :149-154.

Carothers AD, Boyd E, Lowther G, Ellis PM, Couzin DA, Faed MJW , Robb A. Trends in prenatal diagnosis of Down syndrome and other autosomal trisomies in Scotland 1990 to 1994, with associated cytogenetic and epidemiological findings. *Genet Epidemiol*, 1999; 16:179-190.

Cirigliano V, Voglino G, Marongiu A, Canadas MP, Ordonez E, Lioveras E, Plaja A, Fuster C, Adinolfi M. Rapid prenatal diagnosis by QF-PCR:evaluation of 30,000 consecutive clinical samples and future applications. Annual NY Academy of Science, 2006; 1075: 288-298.

Daffos F, Capella-Pavlovsky M, Forestier F. A new procedure for fetal blood sampling in utero : preliminary results in fifty-three cases. Am J Obstet Gynecol, 1983 ; 146 :985-987.

Donaghue C, Mann K, Docherty Z, Ogilvie CM. Detection of mosaicism for primary trisomies in prenatal samples by QF-PCR and karyotype analysis. Prenat Diagn, 2005; 25:65-72.

Donnenfeld AE, Lockwood D, Lamb AN. Prenatal diagnosis from cystic hygroma fluid : The value of fluorescence *in situ* hybridization. Am J of Obstet Gynecol, 2001; 185:1004-1008.

Drets ME, Shaw MW. Specific banding patterns of human chromosomes. Proc. Natl Acad Sci USA, 1971 ; 68(9) :2073-2077.

Dugoff L, Hobbins JC. Invasive procedures to evaluate the fetus. Clin Obstet Gynecol, 2002; 45:1039-1053.

Gole LA, Anandakumar C, Bongso A, Chua TM, Wong YC, Ratnam SS. Analysis of cystic hygroma, ascitic and pleural fluids by conventional lymphocyte culture and fluorescent *in situ* hybridization. Prenatal Diagnosis, 1997; (17):1151-1157.

Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E, Lagerstedt K, Nilbert M. Microsatellite instability and/or immunostaining for diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer ? Virchows Archiv , 2004 ; 444 : 134-141.

Huang DJ, Mergenthaler-Gatfield s, Hahn S, Holzgreve W, Zhong XY. Isolation of cell-free DNA from maternal plasma using manual and automated systems. *Methods Mol Biol*, 2008 ; 444 :203-208.

Jenkins TM, Wapner RJ. First trimester prenatal diagnosis: chorionic villus sampling. *Semin Perinatol* , 1999; 23:403-413.

Klinger K, Landes G, Shook D, Harvey R, Lopez L, Locke P, Lerner T, *et al.* Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Am J Hum Genet*, 1992; 51: 55-65.

Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Étude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *Compt. Rend. Acad. Sci*, 1959; 248:1721-1722.

Leung WC, Lau ET, Lao TT, Tang MH. Can amnio-polymerase chain reaction alone replace conventional cytogenetic study for women with positive biochemical screening for fetal Down syndrome ? *Obstetric and Gynecology*, 2003; 101: 865-861.

Leung WC, Waters JJ, Chitty L. Prenatal Diagnosis by rapid aneuploidy detection and karyotyping : a prospective study of the role of ultrasound in 1589 second-trimester amniocentesis. *Prenat Diagn*, 2004 ; 24(10):790-5.

Leung WC, Lao TT. Rapid aneuploidy testing, traditional karyotyping, or both? *Lancet*, 2005; 366: 97-98.

Magalhães, JAA, Magalhães OA. Medicina Fetal. In: *Rotinas em Obstetrícia*, 4^a ed. Porto Alegre, Artes Médicas, 2001; cap 3, p.46-57.

Mansfield ES. Diagnosis of Down Syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphism. *Hum Mol Genet*, 1993; 2:43-50.

Milunsky A., Milunsky J. Genetic Counseling: Preconception, Prenatal and Perinatal. In: *Genetic Disorders and the Fetus. Diagnosis, Prevention and Treatment*, 4th ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, 1998; cap 1, p.1-52.

Munné S, Magli C, Bahçe M, Fung J, Legator M, Morrison L, Cohert J, Gianaroli L. Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: X,Y, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat Diagn*, 1998; 18 (13):1459-1466.

Nicolaides KH, Snijders RJ, Gosden CM, Berry C, Campbell S. Ultrasonographically detectable markers of fetal chromosomal abnormalities. *Lancet*, 1992; 340 (8821):704-707.

Ogilvie CM, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Mann K. Rapid Prenatal Diagnosis of Aneuploidy using Quantitative Fluorescence-PCR (QF-PCR). *J Histochem & Cytochem*, 2005; 53(3):285-288.

Painter TS. Further observations on sex chromosomes of mammals. *Science*, 1923; Sep 28, 58 (1500): 247-248.

Park SY, Kim JW, Kim YM, Lee MH, Lee MH, Han JY, Kim YM, Yang JH, Ryu HM. Frequencies of Fetal Chromosomal Abnormalities at Prenatal Diagnosis: 10 years experiences in a single institution. *J Korean Med Sci* , 2001; 16:290-293.

Pena SDJ. Molecular Cytogenetics I: PCR-based diagnosis of human trisomies using computer-assisted laser densitometry. *Genet Mol Biol*, 1998; 21(3): 317-322.

Pereira RW, Sturzeneker R, Pena SDJ. Screening fetal losses for monosomy X with a simple PCR-based procedure. *Genet and Mol Biol*, 2000; 23 (1):11-14.

Quintana Aguilar J, Quiñones Maza O, Méndez Rosado LA, Lavista González M, González Noa CE, Hernández Pérez G. Resultados del diagnóstico prenatal cromosómico en Ciudad Habana. *Rev Cuba Obstet Ginecol*, 1999; 25:153-158.

Roeder AD, Elsmore P, Greenhalgh M, McDonald A. Maximization DNA profiling success from sub-optimal quantities of DNA: a staged approach. *Forensic Scienc Intern Genet*, 2009; 3 (2):128-137.

Schinzel, A. Notes on Clinical Findings in Autosomal Chromosome Aberrations. In: *Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man*, Walter de Gruyter Press, 2001, Berlin, New York; p.28-34.

Schmidt W, Jendery J, Hecker K, Hackeloer BJ, Kerber S, Kochhan L, Held KR. Detection of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 by QF-PCR in 662 selected pregnancies at risk. *Mol Hum Reprod*, 2000; 6(9): 855-860.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 2002; 30:57.

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

Shaffer LG, Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Ann Rev Genet*, 2000; 34:297-329.

Steele MW, Breg WR Jr. Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *Lancet*, 1966; 19 (1):383-385.

Steven L. History of Clinical Cytogenetics. In: The Principles of Clinical Cytogenetics, 10th ed. NJ, Humana Press Inc. Toowa, 1999; cap.1., p. 3-8.

Stojilkovic-Mikic T, Mann K, Docherty Z, Ogilvie CM. Maternal cell contamination of prenatal samples assessed by QF-PCR genotyping. *Prenat Diagn*, 2005; 25:79-83.

Teoh TG, Ryan G, Johnson J, Winsor EJ. The role of fetal karyotyping from unconventional sources. *Am J Obstet Gynecol*, 1996; 175 :873-877.

Tóth T, Findlay I, Papp C, Tóth-Pál E, Marton T, Nagy B, Quirke P, Papp Z. Prenatal detection of trisomy 21 and 18 from amniotic fluid by quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *J Med Genet*, 1998; 35:126-129.

Tjio HJ, Levan A. The chromosome numbers of man. *Hereditas*, 1956; 42:1-6.

Warburton D, Dallaire L, Thangavelu M, Ross L, Levin B, Kline J. Trisomy recurrence: a reconsideration based on North American data. *Am J Hum Genet*, 2004; 75:376-385.

Zhou D, Ren Z. Multiplex ligation-dependent probe amplification and its application. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2009; 26(1):45-49.

VII. ANEXOS

VII.1. Parecer do Comitê de Ética do HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP/MS) como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 06-038 **Versão do Projeto:** 16/D3/2006 **Versão do TCLE:** 07/04/2006

Pesquisadores:

ROBERTO GIUGLIANI
REJANE GUS KESSLER
SANDRA LEISTNER SHODA
JOSE ANTONIO DE AZEVEDO MAGALHÃES
MARCELLE REESINK CERSKI
PATRICIA BARRIOS

Título: AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DA ANÁLISE MOLECULAR DE ANEUPLOIDIAS PARA O DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE FETOS POLIMALFORMADOS

- Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

- De acordo com a regulamentação da Resolução 340/2004 do CNS/MS o CEP/HCPA foi credenciado, através da Carta Circular N° 037 CONEP/CNS/MS de 11 de agosto de 2004, para dar aprovação final para este projeto.

Porto Alegre, 10 de abril de 2006.


Prof. Nadine Clausell
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

VII.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Pré-Natal)

Anexo I: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Pré-Natal

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo avaliar a contribuição de técnicas para estudo do DNA bem como dos cromossomos de fetos malformados e sem diagnóstico.

O material necessário para a realização deste estudo será obtido através de uma punção no abdômen da mãe para retirada do líquido (amniótico) que envolve o bebê, ou punção de uma pequena fração da placenta. A punção será realizada com o auxílio do ultrassom, através de um profissional experiente na área. Este procedimento pode causar um pequeno desconforto, e tem um risco em torno de 0,5% de perda da gestação (e morte fetal) por sangramento ou infecção.

O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins deste projeto de pesquisa, sendo garantido o sigilo das informações obtidas, reservando ao paciente ou familiares o acesso às mesmas.

→ Cabe salientar que, por motivos técnicos, não está totalmente assegurado a obtenção de um resultado. Isto pode acontecer pela ausência de células viáveis para o cultivo celular, por contaminação ou falta de crescimento das células. Nestes casos a família será informada sobre as causas do insucesso do exame.

Pelo presente termo, declaro que fui informada sobre o presente projeto de pesquisa de forma clara e detalhada e tive minhas dúvidas esclarecidas.

Fui igualmente informada da garantia de receber resposta sobre a pesquisa a ser realizada, bem como a liberdade de não participar do estudo.

Autorizo a utilização dos dados ou possível material armazenado para este ou para um posterior projeto de pesquisa.

Data:

Assinatura do casal: _____

Nome do Pesquisador para contato: Rejane Gus Kessler Telefone: 21018011

Nome do Pesquisador responsável: Dr. Roberto Giugliani Telefone: 21018011

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA

10/04/06
8 06038

G P P G - Recebido

07 ABR 2006

Por:  Nº 06038

VII.3.Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Pós-Natal)

Anexo II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) Pós-Natal

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo avaliar a contribuição de técnicas para estudo de DNA, bem como estudo dos cromossomos de fetos malformados e seu diagnóstico.

O material necessário para a realização deste estudo será obtido através de uma coleta de sangue ou biópsia de algum outro material do bebê que possa servir para a análise dos cromossomos do mesmo. O tipo de material a ser coletado será determinado pelo obstetra e/ou pediatra de acordo com a situação clínica do recém-nascido, ou feto nascido morto.

O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins deste projeto de pesquisa, sendo garantido o sigilo das informações obtidas, reservando ao paciente ou familiares o acesso às mesmas.

Cabe salientar que, por motivos técnicos, não está totalmente assegurado a obtenção de um resultado. Isto pode acontecer pela ausência de células viáveis para o cultivo celular, por contaminação ou falta do crescimento das células. Nestes casos a família será informada sobre as causas do insucesso do exame.

Pelo presente termo, declaro que fui informada sobre o presente projeto de pesquisa de forma clara e detalhada e tive minhas dúvidas esclarecidas. Foi igualmente informada da garantia de receber resposta sobre a pesquisa a ser realizada, bem como a liberdade de não participar do estudo.

Autorizo a utilização dos dados ou possível material armazenado para este ou para um posterior projeto de pesquisa.

Data:

Assinatura do casal: _____

Nome do Pesquisador para contato: Rejane Gus Kessler Telefone:21018011

Nome do Pesquisador responsável: Dr. Roberto Giugliani Telefone: 21018011

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA

10/04/09
30/03/09

GPPG Recrutado

07/04/2009

Por: _____ Nº 06083

VII.4. Resposta ao artigo submetido à revista *Journal of Biomedicine and Biotechnology*

De: Rasha Magdy [mailto:jbb@hindawi.com]
Enviada em: sexta-feira, 13 de março de 2009 16:44
Para: Rejane Gus Kessler
Cc: jbb@hindawi.com; Sandra Leistner Segal; Maria Teresa Vieira Sanseverino; Jose Antonio De Azevedo Magalhaes; Marcelle Reesink Cerski; Patricia Martins Moura Barrios; Roberto Giugliani
Assunto: JRejane Gus KesslerBB/631931: **Acknowledging Receipt**

Dear Mrs. Gus Kessler,

The Research Article titled "Molecular cytogenetics: the contribution of new techniques to the etiologic diagnosis in fetus with multiple malformations," by Rejane Gus Kessler, Sandra Leistner-Segal, Maria Teresa Sanseverino, Jose Antonio Magalhaes, Marcelle Cerski, Patricia Barrios, and Roberto Giugliani has been received and assigned the number JBB/631931.

An editor will be assigned to handle the review process of your manuscript, and he/she will inform you as soon as a decision is reached.

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript. However, only the submitting author will be able to upload any revisions to the journal's manuscript tracking system.

Thank you for submitting your work to Journal of Biomedicine and Biotechnology.

Best regards,

Rasha Magdy
Journal Publishing Editor
Journal of Biomedicine and Biotechnology
Hindawi Publishing Corporation

VII. 5. Comentário do editor da revista *Genetics and Molecular Biology*



Editorial commentary on the state of clinical genetics in Brazil exemplified by the article on prenatal diagnosis by Kessler *et al.* *Genetics and Molecular Biology* (this issue)

Peter Pearson¹

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

As a relatively recent immigrant from Northern Europe, United Kingdom via the Netherlands, two countries both benefitting from well organised clinical genetic services, it is a great puzzle and worry to me why clinical genetic services, particularly in the public sector, are so badly organised in Brazil. Of course, the short answer is, the field is grossly underfunded. But underlying that simplistic conclusion is the undeniable fact that the Brazilian Ministry of Health at the federal level and various other bodies at the state level have failed to recognise the public health care value of establishing well-organised genetic screening and counselling facilities. Although Brazil can be justly proud of its health care position and initiatives in combating HIV infection and poliomyelitis, amongst others, its record on establishing well-organised and regulated genetic services with appropriate attention to training and professional recognition of genetic counsellors, cytogeneticists, molecular geneticists etc., falls far, far short of what is required and would be acceptable in most other countries.

The *de facto* situation is that anybody with a medical degree can put up a shingle claiming to carry out genetic diagnosis irrespective of training or specialist background. This is a legal loophole, which does not do justice to the technical requirements for genetic diagnosis and counselling or give professional recognition to the people really required to carry out the analyses, who are not usually not medically qualified and learnt their trade in Biology and related areas. Further, the current situation does not require diagnostic centres to provide evidence of proficiency, to submit annual returns on productivity or participate in quality control trials. The rich, particularly in large conurbations such as São Paulo, Porto Alegre, Rio de Janeiro etc.,

are well catered for by private clinics, albeit without any traceable quality control by governmental agencies. Although a few of the private laboratories take part in international quality control programs, this is commercial window dressing and at a national level undesirable. What self-respecting Ministry of Health leaves it to foreign organisations to carry out the quality control work that they should be performing themselves? In Brazil, the basic maxim is, if you can pay for it, then you can get it. The vast majority of the population are either excluded financially from making use of private clinics, or are unaware of the health risks ensuing from genetic disease or find great difficulty in finding a centre prepared to undertake genetic investigation free of charge. And even in situations where the government have taken steps to provide genetic testing within the public sector, such as post-natal chromosome diagnosis, the established level of remuneration is so low, that the diagnostic laboratories cannot afford to carry out cytogenetic analyses without a further source of income to cover the costs. Most or all genetic diagnoses carried out in the public sector in Brazil occur in public universities by people who are already overburdened by teaching and trying to do research, let alone run a genetic service as well. Most receive no remuneration for this and their limited time is donated freely to keep the services running. The bottom line is that the available capacity is far too small for the number of requests and only a small proportion of all applicants actually receive attention within a short period of time. In short, genetic testing within the public health care sector cannot and never will take place adequately without extensive governmental planning, reorganisation and introduction of adequate financial incentives.

Chromosome prenatal diagnosis is now a well-established procedure and passed out of the realms of being experimental more than 15 years ago in most of the developed world. Why then should the GMB choose to publish an article on this subject at this juncture (Kessler *et al.*,

Send correspondence to Peter L. Pearson. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Caixa Postal. 11461, 05422-970 São Paulo, SP, Brazil. E-mail: peterlpearson@uol.com.br.

¹ The writer is one of only two genetic diagnosticians to have been certified for both molecular genetic and cytogenetic diagnosis in the Netherlands. He was the chairman of the Departments of Human Genetics within the medical schools of Leiden and subsequently Utrecht in the Netherlands and was a member of the Dutch ministry of health committee that formulated the genetic health care plan practised in the Netherlands today. He helped negotiate the logistics of financing genetic services with the health care insurers. He is not medically qualified.

2008)? There are two reasons for doing so: through lack of any official avenue for cytogenetic centres to disclose productivity and efficiency rates, the article permits this particular group from Porto Alegre to present its results on carrying out chromosome prenatal diagnosis in the public health-care sector and for the results to be evaluated by others; secondly the article points to many of the inadequacies in Brazilian genetic screening services, not from the point of view of the efficiency of the Porto Alegre group itself, which succeeded remarkably well under the circumstances, but with the problems encountered on the way. Firstly, there are very few centres performing chromosome prenatal diagnosis in the public sector and many of the patients have to travel large distances. The work is specialised and labour intensive. This group was fortunate in that their hospital was prepared to fund the screening, probably accounting why the group could maintain its activities for the 18 year period described in the article. The lack of governmental financial support is one of the main reasons why so few groups are active with chromosome prenatal screening, despite an ever increasing need as physicians and the Brazilian public at large become increasingly aware of the diagnostic possibilities. Of course this situation begs the question of why one would even bother to carry out chromosome prenatal diagnosis when induced abortion is still illegal in Brazil and likely to remain so for a long period of time, but not for ever. Even the prototypically Roman Catholic country Italy legalised abortion 30 years ago despite ongoing controversies and attempts to reverse the law to this day. However, the straight answer for the current Brazilian situation is that knowing before a baby is born that it carries a chromosome abnormality, mentally prepares the parents beforehand on what they can expect at either miscarriage or birth of their child. In countries where induced abortion is legal, prenatal diagnosis is rarely refused even

when the parents announce before hand that whatever the outcome, they will not have the child aborted: the parent's right to know what is in store for them is regarded as sufficient grounds for carrying out chromosome prenatal diagnosis.

How can the Brazilian situation be improved? Since 2004 a working group, composed of members from the two Brazilian Society of Genetics and Medical Genetics, respectively, and technical staff from the Ministry of Health have evaluated the potential need for genetic services nation-wide and drawn up guidelines on minimal requirements for infrastructure and financial commitments. The group also formulated a proposal for setting up a national policy for clinical genetics in the public sector, which includes publicity campaigns on prevention and education directed not only to the general public but also to health professionals. The Ministry of Health should be responsible for setting up such policy as well as monitoring the quality through annual reports. However, 4 years is a long period of time and the crucial question is when will the Ministry of Health finally start making use of the recommendations of the committee and legalise implementation of a Brazilian national program in genetic health care? I would suggest also that, following implementation of the plan the derived criteria of quality control and reporting also be extended to the private sector and make them obligatory for all private centres to stay in business. Only then, will the Brazilian public at large start receiving the quality of genetic health care that it is entitled to.

References

- Kessler RG, Sanseverino MTV, Leistner-Segal S, Magalhães JAA and Giugliani R (2008). Prenatal diagnosis of fetal chromosomal abnormalities: Report of an 18-year experience in a Brazilian public hospital. *Genet Mol Biol* 31:836-840.