



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

ROBERTA MONTEIRO E SILVA DE BARCELLOS

**A UTILIZAÇÃO DA CITOGENÉTICA CONVENCIONAL E MOLECULAR NA
INVESTIGAÇÃO DE ABORTOS ESPONTÂNEOS.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado em forma de artigo como requisito ao curso de bacharelado em Biomedicina no Centro Universitário de Brasília sob orientação da Profa. Ms. Vanessa Carvalho Moreira.

**BRASÍLIA
2017**

A UTILIZAÇÃO DA CITOGÉNÉTICA CONVENCIONAL E MOLECULAR NA INVESTIGAÇÃO DE ABORTOS ESPONTÂNEOS

Roberta Monteiro e Silva de Barcellos¹
Vanessa Carvalho Moreira²

Resumo

Os abortos são frequentes na vida reprodutiva humana e podem ser do tipo espontâneo quando ocorrem antes da 20ª semana de gestação. O campo da citogenética, é aquele que estuda os cromossomos e suas peculiaridades, através dele é possível investigar as possíveis causas da perda, possibilitando assim a obtenção de respostas para alguns questionamentos advindos da perda gestacional, principalmente para a mulher, além de ser uma ferramenta importante no aconselhamento de casais. Trata-se de uma revisão narrativa como o objetivo de elucidar a importância da realização da citogenética convencional e molecular em perdas gestacionais espontâneas, devido ao impacto social causado por este e a possível contribuição através da obtenção de dados genéticos resultantes da investigação, elucidando assim a importância de tais exames serem incluídos na rotina hospitalar.

Palavras-chave: abortos espontâneos; genética humana; citogenética convencional; citogenética molecular.

THE APPLICATION OF CONVENTIONAL AND MOLECULAR CYTOGENETICS IN THE SPONTANEOUS ABORTION INVESTIGATION

Abstract

Abortions are frequent in human reproductive life; they are called spontaneous as gestational losses before the 20th week of gestation. The field of cytogenetics is the one that studies the chromosomes and their peculiarities, in addition to being possible to investigate as possible causes of the loss, thus making it possible to obtain answers to some questions arising from gestational loss, especially for a woman, as well as an important tool in the couples advice. This literature review aims to elucidate a value of the achievement of conventional and molecular cytogenetics in spontaneous gestational losses, due to the social impact caused by this and possible, by obtaining genetic data resulting from the investigation, thus elucidating a value of such exams are Included in the hospital routine.

Keywords: spontaneous abortions; human genetic; conventional cytogenetic; molecular cytogenetic.

¹ Estudante de Biomedicina do UniCEUB

² Professora do Curso de Biomedicina do UniCEUB

1 INTRODUÇÃO

O aborto corresponde ao término de uma gestação intrauterina clinicamente firmada, antes que o produto de concepção atinja idade gestacional viável (HELENO, 2009).

Segundo, RODINI et al., (2004) os abortos ocorrem em 75% dos casos entre 7^a e a 15^a semana de gestação, sendo assim umas das intercorrências médicas mais frequentes. As causas dos abortos espontâneos são diversas e inclui vários fatores. No primeiro trimestre cerca 50% das mortes fetais resultam de alterações cromossômicas. A incidência de perdas fetais varia de 6,5% a 30% em gestações reconhecidas clinicamente, considerando gestações das quais as perdas ocorrem antes do reconhecimento da gestação essa taxa aumenta para 33% a 67% (TEIXEIRA et al.,2009).

As anomalias cromossômicas são causadas por alterações no número ou estrutura dos cromossomos e podem envolver cromossomos autossômicos, cromossomos sexuais ou ambos. Na maioria das doenças cromossômicas pode ser investigada pela realização do cariótipo. Entretanto, algumas anomalias estruturais podem passar despercebidas ao estudo cromossômico que utilize técnicas habituais de citogenética (FONSECA, 2013).

A investigação dos abortos espontâneos ocorre por meio da citogenética, chamada de citogenética clássica convencional, que tem como função estudar os cromossomos, suas implicações e constituição celular. Os cromossomos são estruturas visualizadas durante a divisão celular na fase da metáfase (fase do qual o material genético encontra-se em estágio mais condensado do ciclo celular), que carregam a informação genética de cada indivíduo. Especificamente. O estudo da morfologia permite à visualização e como consequência a avaliação da estrutura cromossômica estrutural e numérica, no qual é realizada a partir da coloração convencional, onde os cromossomos podem ser organizados em conjunto de acordo com tamanho e posição do centrômero. Mediante técnicas de bandeamento, é gerado um padrão de bandas escuras e claras ao longo dos cromossomos, possibilitando a individualização de cada par cromossômico (CHAVES; NICOLAU, 2013).

Geralmente a investigação através da citogenética convencional, resulta em um número significativo de casos sem resultado, além de ser uma investigação demorada. O motivo para tais casos sem resultado explica-se, pois a citogenética convencional requer da disponibilidade de células vivas, que estejam ainda em processo ativo de divisão celular, o que constantemente só é viável através da cultura dos tecidos fetais a longo tempo em laboratório. Os erros na cultura do material de aborto para investigações mais comuns são resultado dos tecidos

macerados, fixados em formol/álcool ou contaminados com bactérias e/ou fungos (PENA et al., 2003).

A citogenética convencional combinada a Biologia Molecular, trouxe como resultado, novas marcações cromossômicas descritas agora na área nomeada de citogenética molecular (CALASANZ et al., 2000). A citogenética molecular permitiu definir o motivo do aborto mesmo se ocorrida a um longo tempo, isso porque é possível sua realização mesmo quando o material de aborto está em soro, álcool, formol, parafina e congelados (MORAES et al., 2005).

A recomendação para a análise cromossômica de material de aborto tem sido o abortamento de repetição, quando é necessário distinguir se a causa da perda foi fetal ou materna. Não há dúvidas que o estudo dos cromossomos nestes casos seja a melhor maneira de determinar a causa. Na presença de cromossomopatias é possível estabelecer a causa como fetal e não é necessária a investigação materna. No entanto, caso não seja observado alteração no cariótipo fetal, haverá a necessidade da investigação materna. Para um eficaz estudo de anomalias cromossômicas, evitando a elevada taxa de insucesso de cultura celular, sugere-se uma combinação de técnicas de análise citogenética que permita o estudo da totalidade do cariótipo ou, pelo menos, das aneuploidias mais frequentemente implicadas como causa de abortamentos espontâneos (BASTOS et al., 2014).

A investigação genética de abortos espontâneos geralmente não é incluída na rotina hospitalar, pois se trata de ocorrência frequente na vida reprodutiva dos casais, sendo somente indicado e investigado aborto de casais que possuem histórico de abortos recorrentes (ROLNIK et al., 2010). A identificação da causa da perda fetal ajuda a estimar os riscos de recorrência em futuras gestações e promover aconselhamento genético para a família (ZANE, 2016). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi apresentar os métodos de diagnósticos na área da citogenética convencional e molecular, demonstrando a importância de sua realização em perdas gestacionais espontâneas.

2. METODOLOGIA

O presente trabalho baseia-se em uma revisão de literatura no formato narrativo, que segundo Cordeiro (2007) é um estudo que não exige um protocolo rígido para a sua realização, possuindo uma captação de artigos aleatória, sem uma fonte pré-determinada, apresentando uma temática mais livre quando comparada a revisão sistemática.

Para tal metodologia foi realizada uma pesquisa por meio dos bancos de dados

bibliográficos PubMed, Google Acadêmico e EBSCO HOST. Na busca, foram utilizadas as seguintes palavras chaves: aborto espontâneo; citogenética convencional; citogenética molecular; genética humana; abortos recorrentes; investigação perdas gestacionais e os mesmos termos em inglês. Para cada busca, mais de 30 trabalhos foram encontrados. Foram selecionados 20 artigos que possuíam um título e resumo relevantes com o contexto do trabalho, com publicação entre os anos 2000 a 2017.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 Abortos genéticos

Abortamento é uma síndrome hemorrágica que finda com morte e/ou expulsão do feto, antes que atinja a sua viabilidade. Os abortos podem ser classificados de diversas formas como espontâneo, quando não há fator que antecipe ou provoque, quando não há ação firmada para interrupção da gestação, pode ser classificado como recorrente quando há três ou mais perdas espontâneas consecutivas até a vigésima semana de gestação e também pode ser classificado em relação a idade gestacional, que pode ser tardia quando ocorre entre a 12^a e 22^a semanas ou precoce, quando ocorre até a 12^a semana, onde representa o maior número de abortos relatados (ZANE et al., 2016).

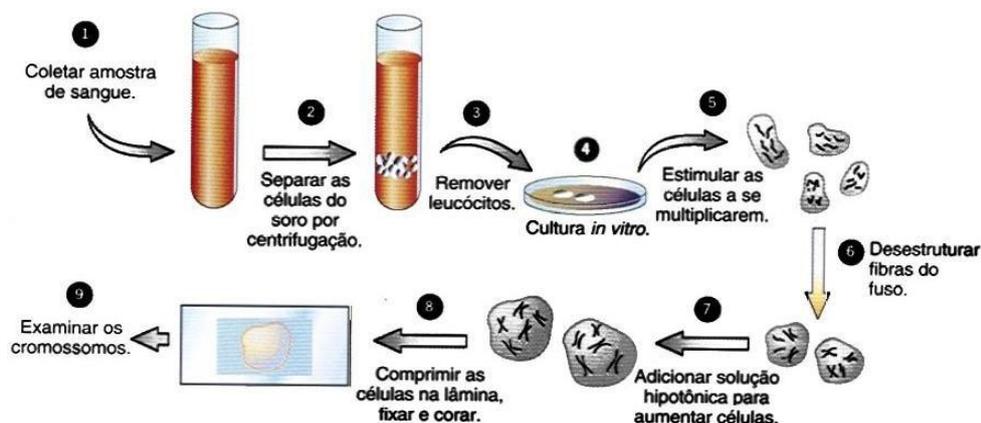
A incidência de perdas fetais, segundo a literatura, varia de 6,5% a 30% em gestações reconhecidas clinicamente. Cerca da metade dos abortamentos espontâneos, ocorrem por anomalias cromossômicas da concepção sendo as aneuploidias as mais frequentes, trissomias são observadas em 50 a 60%, seguidas pelas monossomia do X (15 a 25%) poliplodia (20 a 25%) (TEIXEIRA, 2009).

As trissomias conferem ao portador um ou mais cromossomos extra e trata-se da cromossomopatia mais frequentes encontradas em materiais de aborto das alterações citogenéticas. Dentre as trissomias, a que envolve o cromossomo 16 é a mais frequente e corresponde a um terço das trissomias encontradas em abortos, seguida pela trissomia do cromossomo 22 (responsável pela Síndrome do olho de gato). As trissomias do cromossomo 21 (responsável pela Síndrome de Down), do cromossomo 18 (Síndrome de Edwards) e do cromossomo 13 (Síndrome de Patau) são também observadas com altas frequências (VIEIRA; FERRARI, 2014).

3.2 Citogenética Convencional

A análise microscópica dos cromossomos tem sido o padrão-ouro para o diagnóstico das anomalias cromossômicas desde o desenvolvimento da técnica do bandejamento G, no final da década de 60. Resumidamente, após o período de crescimento celular, é realizado o bloqueio das células em metáfase. Nesta fase, como a duplicação da molécula de DNA já aconteceu, os cromossomos exibem duas cromátides e o centrômero. A técnica inclui o rompimento da membrana celular com uma solução salina hipotônica, fixação e coloração (figura 1). A análise é realizada em, pelo menos, 15 a 20 células (MACHADO, 2010).

Figura 1: Preparação de células para análise citológica.

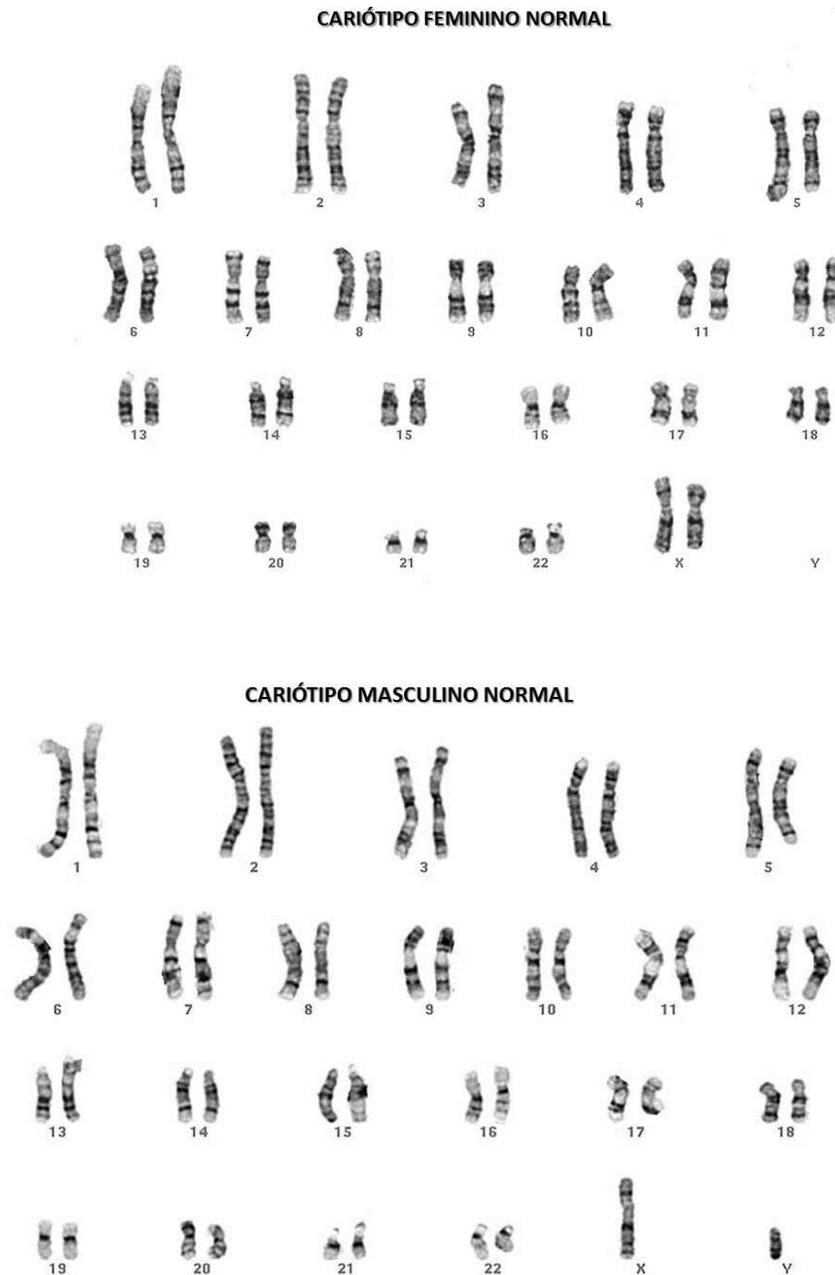


Fonte: Bertuzi (2012).

Os cromossomos analisados são representados na forma de cariótipo onde são organizados e distinguidos, segundo seu tamanho, posição do centrômero e padrões de bandas obtidos após o emprego de técnicas de coloração específicas (figura 2). Um cariótipo é dito normal, segundo as regras de nomenclatura publicadas pela (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) ao apresentar 46 cromossomos, sendo os cromossomos sexuais XX para mulheres e XY para homens (MOREIRA, 2013).

Para melhor visualização dos cromossomos, são utilizadas técnicas de bandejamento que consistem na formação de padrões de bandas específicos para cada cromossomo, do qual as bandas claras intercalam-se com as bandas mais escuras, segundo a sua afinidade com o corante. Essa diferença entre bandas claras e escuras é resultado da composição de bases nucleicas no tempo do ciclo celular do qual ocorre a replicação, número de genes, tipo de cromossomo e sequências repetitivas (CARVALHO, 2009).

Figura 2: Cariótipo Humano normal, 22 pares autossômicos e um par sexual sendo XY em homens e XX em mulheres. Técnica de bandeamento G.



Fonte: Pro Criar (2016).

O Bandeamento G é uma técnica da qual os cromossomos são submetidos a ação de uma enzima proteolítica, como a tripsina e em seguida são corados com coloração Giemsa. Será

obtido um padrão de bandas claras e escuras, sendo as escuras definidas como bandas G (STRACHAN; READ, 2013). As bandas G são as que se utilizam mais frequentemente em qualquer laboratório de rotina, pois o método é simples de executar e a coloração é permanente (OSÓRIO; ROBINSON, 2013). As Bandas R Ou Reverse é o oposto do bandeamento G. Nesta técnica há uma desnaturação do DNA onde há regiões ricas em AT (Adenosina e Timina) através do calor e em solução salina e posteriormente são corados por Giemsa. Obtém-se então bandas claras e escuras típicas de cada cromossomo, inverso daquele obtido no bandeamento G (MALUF; RIEGEL, 2011).

Nas Bandas T são utilizadas para corar segmentos terminais específicos dos cromossomos. O material é colocado em calor severo antes da utilização da coloração com Giemsa e pode ser combinado com a utilização de combinação de corantes padrões com corantes fluorescentes. Trata-se de um método baseado nas bandas R, uma vez que as bandas T são coradas mais intensamente (STRACHAN; READ, 2013).

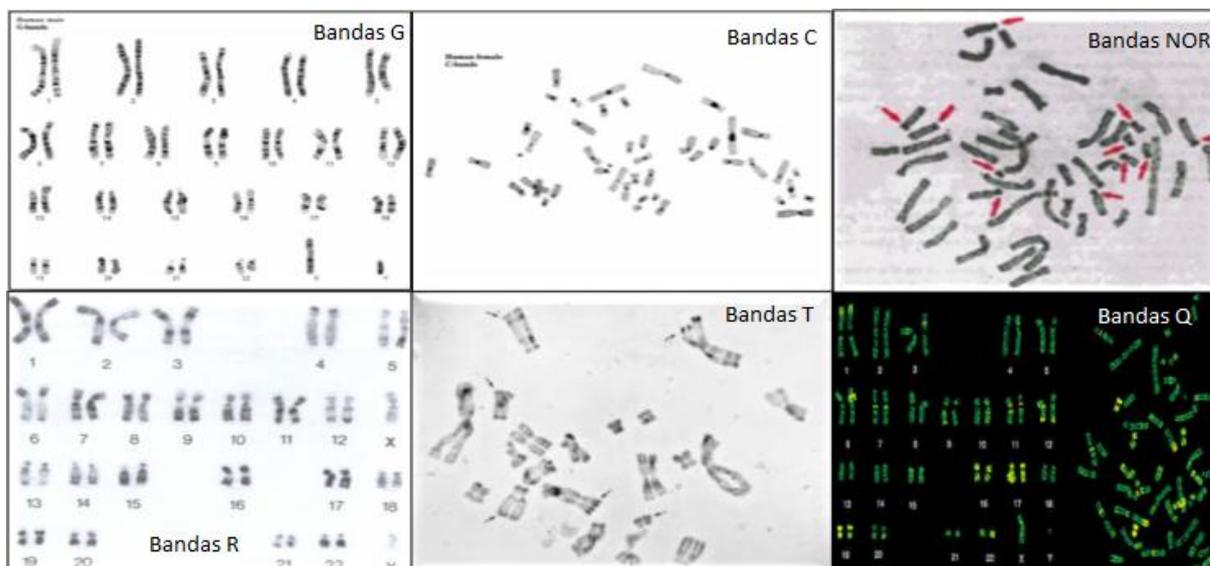
Já as Bandas Q são o primeiro método de diferenciação longitudinal. Baseado na coloração com um corante fluorescente (mostarda de quinacrina) que irá se ligar a regiões do DNA ricas em AT. A observação se dá através da fluorescência emitida usando luz ultravioleta. Os cromossomos irão se corar e formar um padrão específico de bandas brilhantes ou turvas. Os cromossomos não necessitam de nenhum tratamento prévio o que possibilita a melhor preservação da sua morfologia, o que torna esta técnica útil na identificação de heteromorfismos que são alterações genéticas entre indivíduos de uma mesma espécie. As bandas Q são as bandas fluorescentes e elas marcam os mesmos segmentos que as bandas G. Esta técnica apresenta, contudo, uma desvantagem: a fluorescência desvanece rapidamente. Assim sendo, para a análise citogenética de rotina este método foi substituído por técnicas de bandeamento não fluorescente (NUSSBAUM, 2008).

As Bandas C mostram-se a heterocromatina constitutiva que está localizada nas regiões centroméricas dos cromossomos. A técnica envolve a desnaturação dos cromossomos com solução de hidróxido de bário e em seguida é utilizado a coloração de Giemsa. As bandas C são utilizadas para estudo de polimorfismos região justa-centrométrica uma vez que nesta técnica o cromossomo é corado em regiões específicas onde há DNA com alta repetição (OSÓRIO; ROBINSON, 2013). Nas Bandas NOR, os cromossomos são corados em regiões organizadores nucleolares que costumasse encontrar nos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos, estas regiões contêm regiões de DNA repetitivo e sequência de genes ribossômicas. É feita a utilização Prata como corante, denominando assim método Ag-NOR-Banding. Essa técnica de

bandeamento é importante, pois se mostra bastante útil na detecção de polimorfismos, rearranjos e identificação de cromossomos marcados (MALUF; RIEGEL, 2011).

Apesar de o cariótipo ser um exame completo e preciso, ele contém limitações como a redução do poder de automatização, o que exige bastante experiência dos técnicos que realizarão a análise, demora na obtenção de resultados devido à dependência do crescimento celular (8 a 14 dias) além do risco de insucesso da cultura seja por contaminação ou pela ausência de crescimento celular (MOREIRA, 2013). Sendo assim, técnicas moleculares apresentam grande vantagem diagnóstica frente às técnicas convencionais. As técnicas de bandeamento cromossômico seriam as únicas capazes de detectar simultaneamente erros estruturais e numéricos em todos os cromossomos (SANTANA, 2012).

Figura 03: Diferentes técnicas de bandeamento cromossômico.



Fonte: Adaptado Belo (2014).

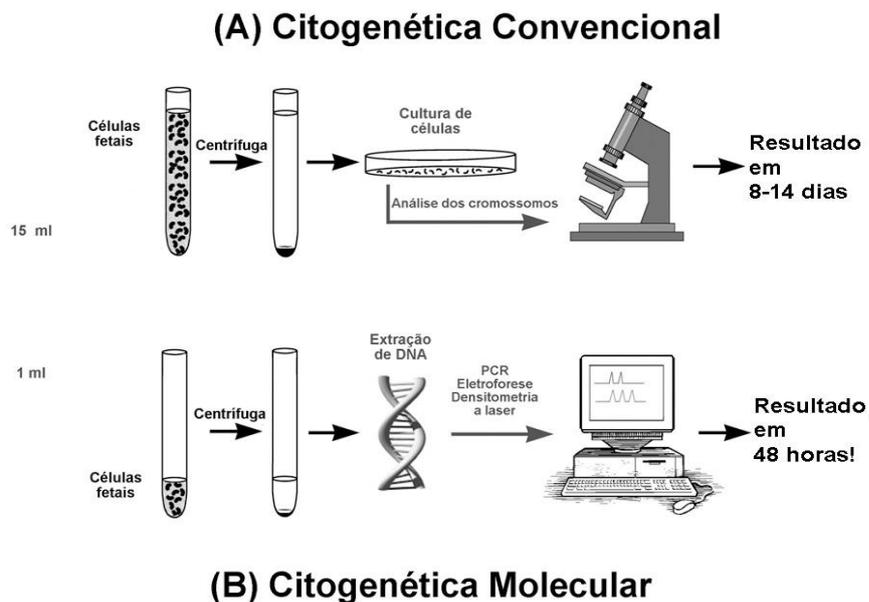
3.3 Citogenética Molecular

A citogenética molecular compreende as técnicas de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), hibridação genômica comparativa (CGH), reação em cadeia da polimerase (PCR), dentre outras e independe de divisão celular (CHAUFFAILLE, 2005).

No caso em que ocorre falha no crescimento celular em materiais de aborto, é viável tentar obter o cariótipo por meio de técnicas de biologia molecular. É importante especialmente nos casos onde há falha de crescimento celular, em abortamentos com grande risco para cromossomopatias, como em casais que dispõem de antecedentes familiares com aneuploidias

ou doenças gênicas ligadas ao X. Outra vantagem dessas técnicas é aquisição de diagnóstico rápido das aberrações cromossômicas numéricas e das doenças ligadas ao sexo. À medida que o estudo citogenético tradicional necessita em média 20 dias para se obter um resultado, isto é, os resultados da FISH e da PCR tornam-se disponível em 24 a 48 horas (figura 4). A desvantagem das técnicas de biologia molecular seria seu alto custo, além de não permitirem a detecção de anomalias cromossômicas estruturais ou mosaicismos (MORAES et al., 2005).

Figura 4: Comparação do método de citogenética convencional e Molecular.



Fonte: Laboratório Gene (2016).

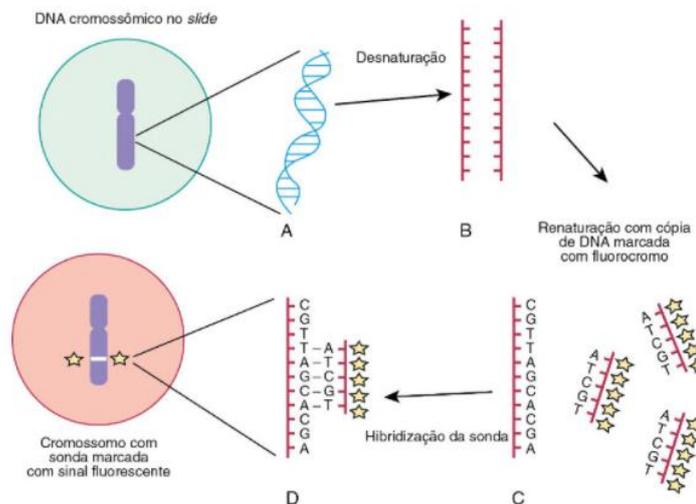
3.3.1 Técnica de Hibridização *in situ* - FISH

O desenvolvimento da técnica de hibridização *in situ* foi um marco na transição da citogenética clássica para a era da citogenética molecular, uma vez que possibilita a melhor integração entre biologia molecular, genética molecular e citogenética convencional (BRAMMER, 2007).

A técnica de hibridização *in situ* possibilita identificar as sequências de DNA em cromossomos meiótico ou mitótico, sendo em fibras estendidas ou em núcleos interfásicos. O FISH é capaz então de detectar aneuploidias presentes em materiais fetais mais comuns, por isso é utilizada em teste pré-natal do qual inclui sondas específicas para determinados cromossomos (ANDARI, 2015).

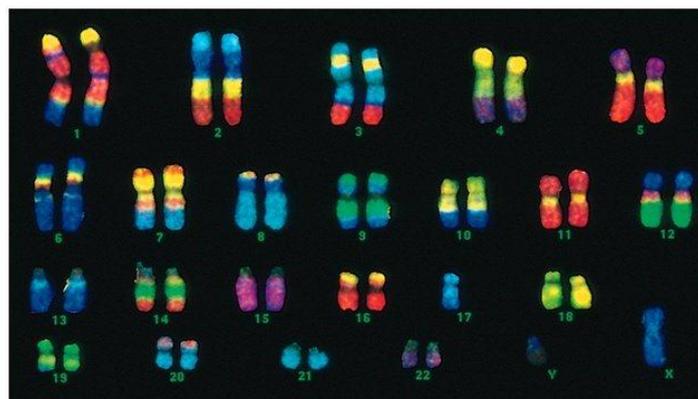
Os passos para a realização dessa técnica envolvem: a preparação de lâminas, seguido do isolamento e marcação da sequência de DNA alvo *in situ* e por fim, a hibridização nos cromossomos. O DNA marcado irá funcionar como uma sonda do qual terá função de encontrar as sequências do DNA cromossomal e complementa-la, chamada de DNA alvo. Para a visualização das regiões que foram hibridizadas com sonda, é necessário associar um corante à sonda e outro corante ao restante dos cromossomos, conforme figura 5 e 6 (BRAMMER, 2007).

Figura 5: Métodos de pintura cromossômica e base da FISH.



Fonte: Kliegman, Jenson e Behrman (2013).

Figura 6: Cromossomo X anormal, identificado, presente no braço curto do cromossomo.



Fonte: Naoum (2001).

A técnica de FISH consiste no fato do DNA, ser formado por duas fitas complementares, do qual é possível desnaturar e renaturar de modo que voltem a ser fita dupla. Na fase de

renaturação as sondas (DNA marcados com fluorocromos) disponíveis competirão com as fitas de DNA e ocorrerá a hibridização na região correspondente no interior da célula, isto é, *in situ* (no sitio correspondente aquela sequência), o que permitirá sua localização precisa, tanto em núcleos interfásicos quanto em cromossomos (BRAMMER, 2007).

A técnica de FISH tem uma limitada capacidade de diagnóstico, isso porque é uma técnica de estudo direcionada aos cromossomos selecionados, também não é capaz de diagnosticar alterações cromossômicas equilibradas, isto é, quando o conjunto cromossômico possui o complemento normal de informações, todas as informações genéticas estão presentes, porém acondicionadas de modo diferente. Outra desvantagem alto preço dos painéis de sondas que resulta, na prática, a pouca utilização da técnica de FISH (MOREIRA, 2013).

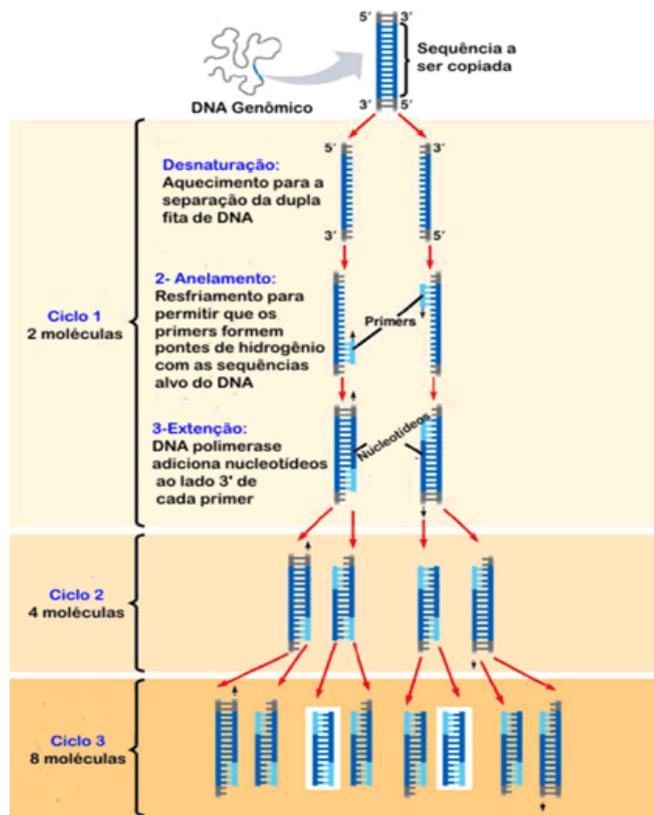
A aplicação da técnica de FISH na investigação de abortos espontâneos tem possibilitado a visualização de sequências específicas de ácidos nucleicos em amostras e materiais de aborto, FISH atualmente tem sido aplicada cada vez mais como coadjuvante da citogenética, isto porque é um método rápido e seguro para detectar aneuploidias, sendo que as sondas centroméricas habitualmente utilizadas são as dos cromossomos 13, 18, 21, 16, 22, 15, X e Y (MORAES et al.,2005).

3.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de PCR baseia-se na amplificação e detecção *in vitro* de regiões de ácidos nucleicos específicos, por meio da técnica é possível obter um número alto de cópias de uma sequência específica de DNA que deseja estudar, a partir de uma fita molde (figura 7) (CAMARGO, 2011).

A PCR oferece algumas vantagens como o fato de não ser preciso isolar o DNA do qual pretende ampliar, isso se deve a especificidade dos oligonucleotídeos utilizados, é uma técnica rápida e segura. Em desvantagens está a necessidade de conhecer a sequência de DNA a ser amplificado, para a síntese de oligonucleotídeos específicos além de que a extensão possível de amplificação é limitada em 2-300 kb (REGITANO, 2001).

Figura 7: Passos da PCR.



Fonte: (Só Biologia, 2017).

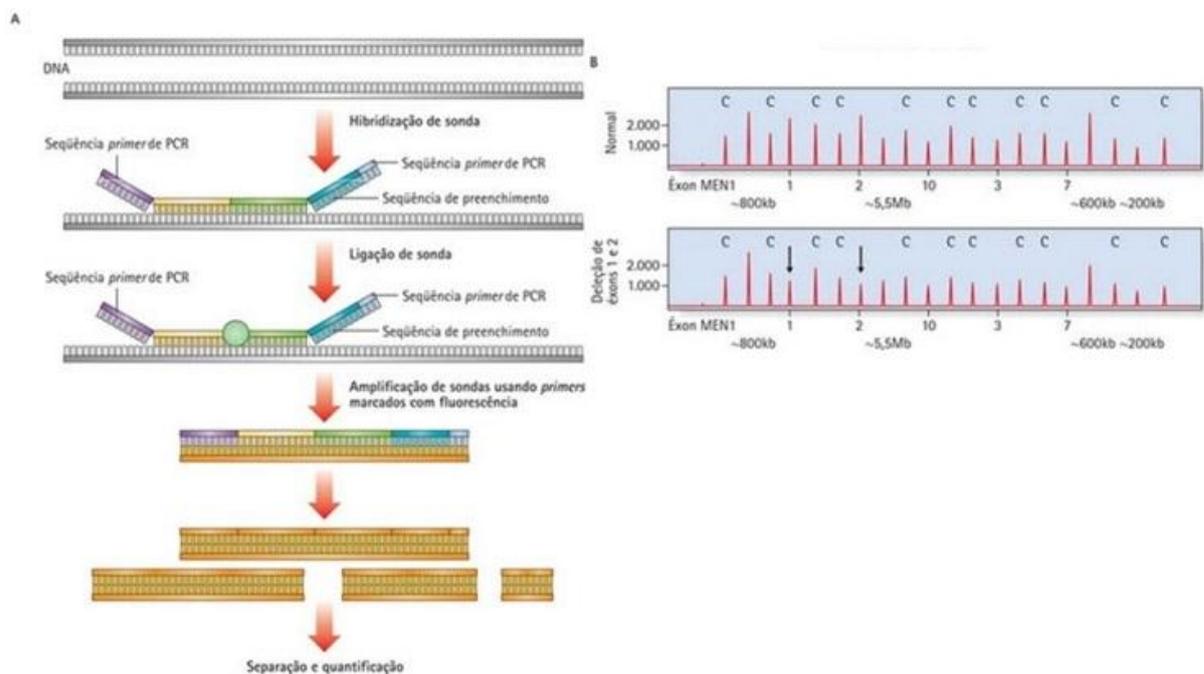
Esta técnica possibilita em uma única reação de PCR detectar aneuploidias mais comuns, exclusão/detecção de triploidias e exclusão/detecção de contaminação materna. Contudo, é uma técnica que apenas permite identificar as anomalias que estão a ser estudadas, não detectando rearranjos cromossômicos que envolvam regiões fora das localizações dos STRs (sequências cromossômicas repetidas e altamente polimórficas) utilizados, nem alterações equilibradas (MOREIRA, 2013). Nas investigações de abortos espontâneos a PCR tem sido utilizada principalmente para a investigação das principais trissomias, da triploidia e da monossomia do X (PENA et al., 2003).

3.3.3 “*Multiplex ligation probe-dependent amplification – MPLA*”

O MLPA (Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification) é uma técnica de biologia molecular semi-quantitativa baseada no ensaio de PCR - Multiplex do qual o DNA que se deseja estudar é hibridizado utilizando sondas (sequências de DNA ligadas a fluorocromos)

que ligam-se a sequências de DNA que são complementares, permitindo então detectar alterações no número de cópias ao nível genômico, trata-se de uma técnica rápida e simples (ANDARI, 2015). É uma técnica que possibilita detectar deleções/duplicações em uma grande variedade de regiões do genoma podendo ser utilizada o DNA ou mRNA, essa técnica consiste na amplificação de um número grande de sequência de DNA (cerca de 40-45 ng) em uma única reação como na figura 7 (CARVALHO, 2009).

Figura 7: Ilustração da técnica de MLPA. B, Detecção de uma deleção envolvendo os éxons 1 e 2 do gene MEN1 e sonda controle.



Fonte: Turnpenny e Ellard (2011).

Entre as vantagens do MLPA está o número alto de análises das sequências em uma única reação, fácil execução e interpretação, reprodutível, sensível, pois requer apenas 40 ng de DNA, rápida (resultado em 24 horas), precisa de poucos equipamentos para sua execução, necessários apenas de um termociclador e sequenciador automático. Em questão de desvantagens está a impossibilidade de detectar triploidias no caso do sexo feminino, não detecta trissomias parciais ou mosaico, desde que não se utilizem sondas localizadas nas regiões das anomalias, não detecta contaminação materna e anomalias estruturais equilibradas (CARVALHO, 2009).

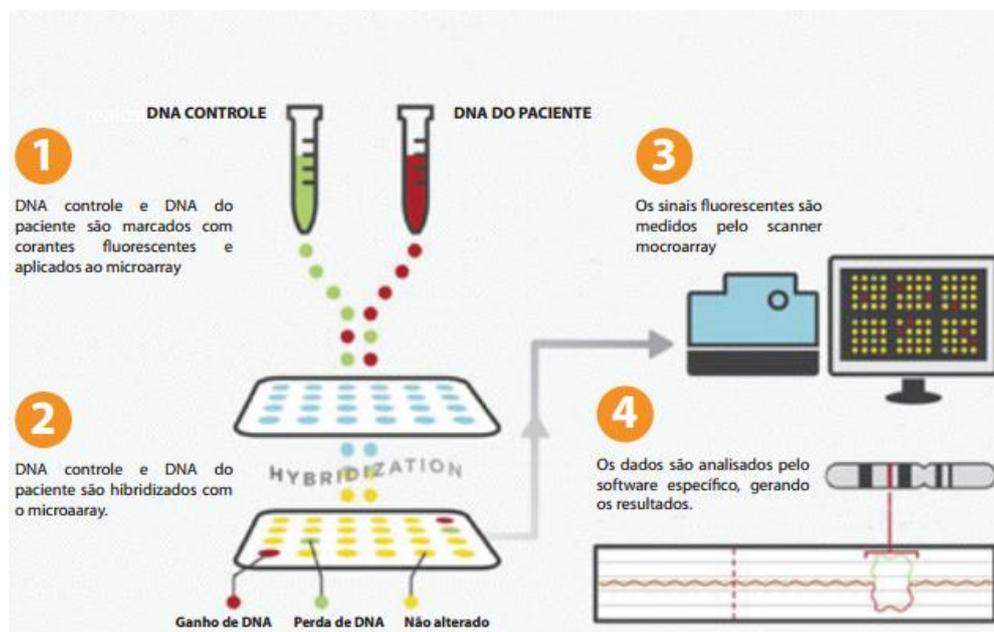
Uma das aplicações desta técnica, tem sido a investigação pós-natal de alterações de aneuploidias cromossômicas e no diagnóstico de um número cada vez maior de síndromes de

microdeleção/microduplicação recorrentes, como a síndrome de DiGeorge e a Williams entre outras, o que possibilita a substituição pouco a pouco a análise por FISH convencional (KONIALIS et al., 2011).

3.3.4 Hibridização Genômica Comparativa – CGH

A hibridização genômica comparativa (comparative genomic hybridization – CGH) foi desenvolvida como método de rastreamento genômico amplo, na tentativa de se identificar desequilíbrios no número de cópias do DNA, ou seja, as instabilidades genômicas. Desenvolvida em 1992, a técnica de CGH como mostrado na figura 8, consiste na hibridização competitiva de DNA teste e DNA normal, marcados com fluorocromos diferentes. A técnica original utilizava metáfases normais fixadas em lâmina e é conhecida como CGH metafásico, cromossômico ou convencional (MACHADO et al., 2012).

Figura 8: Técnica de hibridização genômica comparativa.



Fonte: Padrão (2016).

Tanto o MLPA quanto o FISH, são ferramentas de diagnóstico de análise específica, por isso não dispensa a necessidade de um cariótipo para o diagnóstico. Cada técnica possuem suas vantagens e desvantagens necessário assim o conhecimento de cada técnica molecular e sua aplicabilidade como mostrado no quadro 1. Devido às limitações do cariótipo, outras técnicas moleculares foram criadas para melhorar a identificação de desequilíbrios genéticos,

uma dessas técnicas é a CGH (Array- Comparative Genomic Hybridization) (LINHARES, 2012).

Quadro 1 : Vantagens e desvantagens entre as técnicas de diagnóstico molecular.

	FISH	PCR	MLPA	CGH
VANTAGENS	<ul style="list-style-type: none"> - Análise rápida e fácil. - Possível análise em células interfásicas - Detecta várias regiões subtelerômicas <ul style="list-style-type: none"> - Detecção > 80kb. 	<ul style="list-style-type: none"> - Técnica rápida e segura; - Detecta aneuploidias comuns, exclusão/detecção de triploidias e contaminação materna. 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto número de análises das sequências em uma única reação. - Fácil execução e interpretação; Reprodutível; - Sensível (40 ng) de DNA, - Rápida (24 horas); - Poucos equipamentos: termociclador e sequenciador automático. 	<ul style="list-style-type: none"> - Análise genômica
DESvantagens	<ul style="list-style-type: none"> - Limitada capacidade de diagnóstico - direcionado a cromossomos selecionados; - Não detecta alterações cromossômicas equilibradas; - Alto custo (painéis de sondas). 	<ul style="list-style-type: none"> - Precisa conhecer a sequência de DNA a ser amplificado - síntese de primers específicos. - Não detecta rearranjos cromossômicos fora das STRs. 	<ul style="list-style-type: none"> - Não detecta triploidias no sexo feminino; Trissomias parciais; Mosaicos; contaminação materna e anomalias estruturais equilibradas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Incapaz de detectar rearranjos balanceados; Rearranjos balanceados. - Dificuldade de detectar mosaicismos baixos

Fonte: Linhares (2012).

A técnica de CGH tem como objetivo detectar diferenças nos números de cópias de qualquer sequência de DNA de um indivíduo. Nesta técnica acontece uma hibridização competitiva de DNA teste e DNA normal, marcados com fluorocromos diferentes. As sondas são obtidas a partir de DNA do organismo do qual deseja-se testar e de DNA de um organismo normal do qual serão marcados com fluorocromos que emitem sinais fluorescentes diferentes, cor verde

o DNA do qual se deseja testar e vermelho o DNA do organismo normal. A técnica oferece importantes vantagens sobre os métodos de citogenética convencional, pois, além de não ser necessária a obtenção de cultura celular, é possível a análise do DNA extraído de diferentes tipos de tecidos em parafina e há a capacidade de investigar, em uma única análise, milhares de regiões cromossômicas, detectando perdas e ganhos cromossômicos submicroscópicos em um único exame. O exame CGH permite o diagnóstico clínico das anormalidades cromossômicas em uma alta resolução e representa a integração da genética convencional e a molecular. Pode-se aplicar o método de CGH para a detecção de alterações no número de cópias variantes (CNV - *copy-number variations*) em uma resolução tão baixa quanto 1Kb de matrizes no genoma (PRATTE-SANTOS et al., 2016).

Uma das principais aplicações do o CGH no diagnóstico de abortos é utilização para o estudo de alterações cromossômicas desequilibradas, em nível de todo o genoma e com maior resolução comparativamente a outras tecnologias. Deste modo, a sua utilização tem vindo a aumentar gradualmente no âmbito do diagnóstico pós-natal e em situações pontuais no diagnóstico pós-natal (ANDRE et al.,2009).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação do aborto espontâneo permite esclarecer respostas para perguntas advindas da perda para os familiares, justificando sua ocorrência e, além disso, fornecem dados que contribuem para área científica. Abortos não recorrentes acabam por não serem investigados, pois considera-se que não há justificativa por ser um evento comum na vida reprodutiva humana, com isso dados e informações são perdidos tanto para familiares quanto para área científica. A investigação é realizada através da citogenética convencional, através do bandeamento cromossômico, porém esta técnica tem suas limitações o que gera casos sem respostas.

A citogenética molecular possibilitou a resolução de casos onde a citogenética convencional não é possível, pois não necessita de células em processo ativo de divisão celular. Sendo assim, cada técnica apresentada possui suas vantagens e desvantagens, diante da importância da obtenção de uma resposta plausível para as perdas gestacionais, é importante que as investigações das perdas gestacionais sejam adotadas como parte da rotina hospitalar, e que haja também a possibilidade caso, não solucionado com citogenética convencional, a associação com as técnicas de citogenética molecular.

5. REFERÊNCIAS

- ANDARI, V.C.M. **Testes genéticos não invasivos no pré-natal: benefícios e limitações dos exames disponíveis**. 81 f. Tese de Mestrado – Faculdade de ciências médicas da Santa Casa de São Paulo. São Paulo, 2015.
- ANDRE, F. et al. Molecular Characterization of Breast Cancer with High-Resolution Oligonucleotide Comparative Genomic Hybridization Array. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, PA, v.15 n.2 p. 441-451, jan. 2009
- BASTOS, R. et al. Estudo da Prevalência de Anomalias Cromossômicas em Abortamentos Espontâneos ou Mortes Fetais. **Acta Medica Portuguesa**, Lisboa, v. 27, n. 1, p. 42-48, jan./fev. 2014.
- BORGES-OSÓRIO, M. R.; ROBINSON, W. M. **Genética humana**. 3ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2013. 775 p.
- BRAMMER, S. P.; ZANOTTO, M.; CAVERZAN, A. **Citogenética vegetal: da era clássica à molecular**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. (Embrapa Trigo. Documentos online, 85). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do85.htm. Acesso em: 22 maio, 2017.
- CALASANZS, M.J et al. Técnicas de Citogenética Molecular: Aplicaciones en el diagnóstico e investigación del câncer. **Revista Española de Patología**, vol. 33 n.4 p 357-369, jan. 2000.
- CAMARGO, C.F.; SILVA, P.R.Q. Aplicações das técnicas de PCR e suas técnicas derivadas em diagnóstico molecular. **Anais da 6ª Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC Goiás**, Goiânia, 2011. Disponível em: <http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/CLEYTON%20FLORENCIO%20DE%20CAMARGO%20E%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>. Acesso em: 25 out. 2017.
- CARVALHO, A.V.C. **Avaliação de técnicas de estudo cromossômico de produtos de abortamento: Citogenética convencional versus Biologia Molecular (MLPA e QF-PCR)**. 92 f. Tese Mestrado - Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. 2009.
- CHAUFFAILLE, M.L.F, Citogenética e Biologia molecular em leucemia linfocítica crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 27 n.4 p. 246-252, dez. 2005.
- CHAVES, T.F; NICOLAU, L.S. Citogenética e Cariotipagem Humana. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, Curitiba, v. 4 n.2, p. 57-66, jul/dez. 2013.
- HELENO, S.S.A. **Fatores Genéticos e Cromossomais na Perda Gestacional**. 38 f. Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto 2014.
- KONALIS, C. et al. Uncovering recurrent microdeletion syndromes and subtelomeric deletions/duplications through non-selective application of a MLPA-based extended prenatal

panel in routine prenatal diagnosis. **Prenatal Diagnosis**, San Diego, Estados Unidos. V. 30, n.6, p. 571-577, jun, 2011.

LABORATORIO GENE. **Citogenética molecular pela PCR**. Disponível em: <http://laboratoriogene.info/DXPN/QF-PCR.html>. Acesso em: 11 set. 2017.

LINHARES, N. D. et al. Diagnóstico citogenético de pacientes com retardo mental idiopático. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 38, n.1, p. 33-39, fev. 2012.

MACHADO, I.N. et al. Testes genéticos em diagnóstico pré-natal: onde estamos, para onde vamos. **Femina**, São Paulo, v.40, n.2, p 87-96, mar. /abr. 2016.

MALUF, S.W; RIEGEL, M. **Citogenética Humana**. 1ªed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

MORAES, A. et al. Abordagem citogenética e molecular em material de abortos espontâneos. **Revista Brasileira de Ginecologia Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 9, p. 554-560, set. 2005.

MOREIRA, M.F. **Pesquisa rápida de aneuploidias em diagnóstico pré-natal: Recomendações**. 81 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina do Porto, 2013.

NAOUM, Paulo C. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 23, n. 2, p. 111-119, ago.2001.

NUSSBAUM, R.; MCINNES, R.R. **Thompson & Thompson: Genética Médica**. 7º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

PENA, S. et al. Investigação genética dos abortamentos espontâneos pelo DNA. **Revista Medica de Minas Gerais**, Belo Horizonte v.13, n.3, p.164-173, jul. /set.2003.

PRATTE-SANTOS, R. et al. Análise de anomalias cromossômicas por CGH-array em pacientes com dismorfias e deficiência intelectual com cariótipo normal. **Einstein**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 30-34, mar. 2016.

PRO CRIAR. **Aconselhamento Genético**. Disponível em: <http://laboratoriogene.info/DXPN/QF-PCR.html>. Acesso em: 12 out 2017.

REGITANO, L. C. de A.; COUTINHO, L. L. (Ed.). **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p. 215, 2001.

ROBERT, M. KLIEGMAN. et al. **Nelson, Tratado de Pediatria**. 19ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

RODINI, E. S. O. et al. Abortamentos espontâneos: estudos citogenéticos e riscos de recorrência. **Arquivos de Ciências da Saúde**, São José do Rio Preto, v. 11, n. 1, p. 37, jan. /mar. 2004.

ROLNIK, Daniel Lorber et al. Análise citogenética em material de abortamento espontâneo. **Revista da Associação Medica Brasileira**, São Paulo, v. 56, n. 6, p. 681-683, 2010.

SANTANA, V.P. **Correlação entre aneuploidia cromossômica em espermatozoides e taxa de implantação embrionária**. 2012. 93 f. Monografia de Graduação – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Botucatu, 2012.

SO BIOLOGIA, **A multiplicação dos fragmentos de DNA**. Disponível em: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Biotecnologia/PCR.php>. Acesso em: 02 out 2017.

STRACHAN, T.; READ, A. **Genética Molecular Humana**. 4º Edição. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TEIXEIRA, Aline C.Z. et al. Estudo citogenético de abortos espontâneos. **Arquivos de Ciências da Saúde**, São José do Rio Preto, v. 16, n.2, p. 59-61, abr./jun. 2009.

TURNPENNY, P. T.; ELLARD, S. **Emery's elements of medical genetics**. Ed.13. p. 445. Atlanta: Elsevier Health Sciences, 2011.

VIEIRA, S.R; FERRARI, L.P. Investigação de alterações em abortos espontâneos: um retrospecto de 2006 a 2011 Investigation of cytogenetic alterations in spontaneous miscarriages: a retrospecto from 2006 to 2011. **Caderno da Escola da Saúde**, Curitiba, v.2, n.1, p.1-20, 2014.

ZANE, L. et al. Anomalias cromossômicas em abortos espontâneos em uma maternidade pública do município de Vitória, Espírito Santo, Brasil. **Revista Salus**, Vitória, v.2, n.1, p 51-58, maio 2016.