

MECANISMOS GENÉTICOS SUBJACENTES AO ABORTAMENTO ESPONTÂNEO

ANÁLISE POR HIBRIDIZAÇÃO GENÓMICA COMPARATIVA E
EXPRESSÃO DE GENES SUJEITOS A *IMPRINTING* GENÓMICO

SOFIA DÓRIA PRÍNCIPE DOS SANTOS CERVEIRA

**DOUTORAMENTO EM BIOMEDICINA
PORTO 2010**

Título Mecanismos genéticos subjacentes ao abortamento espontâneo

Autor Sofia Dória Príncipe dos santos Cerveira

Edição Do Autor

ISBN 978-989-20-2092-1

Ano 2010

**DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE DOUTOR EM BIOMEDICINA
APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO**

Artigo 48º, § 3º - A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação. (Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto – Decreto-Lei Nº19337, de 29 de Janeiro de 1931).

Orientação: Prof. Doutora Filipa Carvalho

Co-Orientação: Prof. Doutor Mário Sousa

Membros do Júri:

Prof. Doutor Agostinho Marques

Prof. Doutor Alberto Barros

Prof. Doutora Isabel Marques Carreira

Prof. Doutora Ana Berta Sousa

Prof. Doutor Sérgio Castedo

Prof. Doutora Filipa Carvalho

Corpo Catedrático da Faculdade de Medicina do Porto

Professores Catedráticos Efectivos

Doutor Manuel Maria Paula Barbosa
Doutor Manuel Alberto Coimbra Sobrinho Simões
Doutor Jorge Manuel Mergulhão Castro Tavares
Doutora Maria Amélia Duarte Ferreira
Doutor José Agostinho Marques Lopes
Doutor Patrício Manuel Vieira Araújo Soares da Silva
Doutor Daniel Filipe Lima Moura
Doutor Alberto Manuel Barros da Silva
Doutor José Manuel Lopes Teixeira Amarante
Doutor José Henrique Dias Pinto de Barros
Doutora Maria de Fátima Machado Henriques Carneiro
Doutora Isabel Maria Amorim Pereira Ramos
Doutora Deolinda Maria Valente Alves Lima Teixeira
Doutora Maria Dulce Cordeiro Madeira
Doutor Altamiro Manuel Rodrigues Costa Pereira
Doutor Rui Manuel Almeida Mota Cardoso
Doutor António Carlos Freitas Ribeiro Saraiva
Doutor Álvaro Jerónimo Leal Machado de Aguiar
Doutor José Carlos Neves da Cunha Areias
Doutor Manuel Jesus Falcão Pestana Vasconcelos
Doutor João Francisco Montenegro Andrade Lima Bernardes
Doutora Maria Leonor Martins Soares David
Doutor Rui Manuel Lopes Nunes
Doutor José Eduardo Torres Eckenroth Guimarães
Doutor Francisco Fernando Rocha Gonçalves
Doutor José Manuel Pereira Dias de Castro Lopes
Doutor José Manuel António Caldeira Pais Clemente
Doutor Abel Vitorino Trigo Cabral

Professores Jubilados ou Aposentados

Doutor Abel José Sampaio da Costa Tavares
Doutor Alexandre Alberto Guerra Sousa Pinto
Doutor Amândio Gomes Sampaio Tavares
Doutor António Augusto Lopes Vaz
Doutor António Carvalho Almeida Coimbra
Doutor António Fernandes da Fonseca
Doutor António Fernandes Oliveira Barbosa Ribeiro Braga
Doutor António Germano Pina Silva Leal
Doutor António José Pacheco Palha
Doutor António Luís Tomé da Rocha Ribeiro
Doutor António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira
Doutor Artur Manuel Giesteira de Almeida
Doutor Belmiro dos Santos Patrício
Doutor Cândido Alves Hipólito Reis
Doutor Carlos Rodrigo Magalhães Ramalhão
Doutor Cassiano Pena de Abreu e Lima
Doutor Daniel Santos Pinto Serrão
Doutor Eduardo Jorge Cunha Rodrigues Pereira
Doutor Fernando de Carvalho Cerqueira Magro Ferreira
Doutor Fernando Tavarela Veloso
Doutor Francisco de Sousa Lé
Doutor Henrique José Ferreira Gonçalves Lecour de Meneses
Doutor Joaquim Germano Pinto Machado Correia da Silva
Doutor José Augusto Fleming Torrinha
Doutor José Carvalho de Oliveira
Doutor José Fernando Barros Castro Correia
Doutor José Manuel Costa Mesquita Guimarães
Doutor Levi Eugénio Ribeiro Guerra
Doutor Luís Alberto Martins Gomes de Almeida
Doutor Manuel Augusto Cardoso de Oliveira
Doutor Manuel Machado Rodrigues Gomes
Doutora Maria da Conceição Fernandes Marques Magalhães
Doutora Maria Isabel Amorim Azevedo
Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga
Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães
Doutor Valdemar Miguel Botelho dos Santos Cardoso
Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor Alberto Barros gostaria de agradecer a forma como me recebeu neste Serviço, e a confiança que sempre depositou em mim ao longo destes 13 anos. Obrigada pelo incentivo, pelo exemplo e ensinamentos que me transmitiu. Obrigada pelas palavras sempre amigas, pela forma como fez crescer este Serviço ao qual em muito me orgulho de pertencer.

À Prof. Doutora Filipa Carvalho, orientadora deste trabalho agradeço todos os bons conselhos, a ajuda preciosa e revisão muito cuidada de todo o trabalho científico que permitiu a elaboração desta tese. À Filipa, amiga, agradeço toda a amizade e os bons momentos que passámos juntas, no trabalho e fora dele.

Ao Prof. Doutor Mário Sousa agradeço a co-orientação desta tese, os sábios conselhos e revisão cuidada dos trabalhos científicos. Obrigada pela ideia de estudarmos o *imprinting* no abortamento espontâneo.

À Prof. Doutora Alexandra Matias agradeço a revisão cuidada desta dissertação bem como dos outros trabalhos conducentes a esta Tese. Agradeço o entusiasmo com que sempre encarou todos os trabalhos e projectos em que fomos colaborando, o constante incentivo e forte motivação, que muito bem sabe transmitir, e que foram muito importantes para a conclusão de mais esta etapa. Agradeço muito especialmente a amizade e carinho que sempre me transmitiu.

Ao Prof. Doutor Nuno Montenegro, na qualidade de Director do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, agradeço a excelente colaboração com o Serviço de Genética e o envio de amostras permitindo a realização deste estudo. Agradeço ainda a todos os médicos e profissionais que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Acácio Rodrigues, na qualidade de Director do Serviço de Microbiologia agradeço a disponibilização do aparelho de qRT-PCR, o que permitiu a realização de parte do trabalho experimental desta Tese. O meu agradecimento especial à Elisabete, à Isabel, à Sofia e à Rita por toda a simpatia e disponibilidade.

À Dra. Otília Brandão agradeço toda a amizade, ensinamentos, disponibilidade e colaboração em todos os trabalhos que fomos partilhando. Obrigada por tudo.

À Susana Fernandes agradeço toda a amizade e disponibilidade. Obrigada, muito especialmente por este último ano e por ter podido contar sempre contigo. Sem ti tudo teria sido muito mais difícil...

À Dra. Carla Ramalho agradeço toda a amizade, disponibilidade e imprescindível ajuda na recolha de material e da informação clínica para a elaboração desta Tese. Obrigada pela revisão de alguns dos trabalhos e pela preciosa colaboração que muito contribuiu para o sucesso deste trabalho.

À Dra. Salomé e às minhas meninas da Citogenética, Lina, Maria João, Vânia e Carolina obrigada pela amizade, pelas longas horas ao microscópio e por tudo o que aprendemos e vamos aprendendo juntas.

AGRADECIMENTOS

À Berta, agradeço a amizade e colaboração na realização de um dos trabalhos incluídos nesta Tese.

À Cristina Joana agradeço a amizade e disponibilidade para discutir o *imprinting*.

À D. Fernanda, à D. Filomena, à Ana Maria e à Maria José agradeço toda a amizade, disponibilidade e ajuda em parte do trabalho experimental incluído nesta tese.

Ao Prof. Doutor João Paulo Oliveira e à Prof. Doutora Carla Moura agradeço a amizade e incentivo.

À Prof. Doutora Beatriz Porto agradeço ter-me iniciado e transmitido o gosto pela Citogenética. Obrigada por me ter ajudado a criar “alicerces sólidos” que me permitiram adquirir confiança na minha actividade profissional.

Ao Prof. Doutor Sérgio Castedo, gostaria de agradecer os sábios conselhos e ensinamentos. Obrigada por me ter ajudado a crescer no Serviço de Genética e pela confiança que sempre depositou em mim. Obrigada por toda a amizade e apoio que me transmitiu sempre que necessitei.

À Tiza agradeço a amizade, apoio e incentivo que sempre me demonstrou. Obrigada principalmente por estes últimos anos, em que fizemos crescer a nossa amizade e pelos excelentes momentos que fomos partilhando juntas.

À Cláudia agradeço todos os bons momentos que passámos juntas no Serviço de Genética e também fora dele, e por tudo o que fomos partilhando ao longo destes anos. Ainda nos fazes falta por aqui, amiga...

À Verinha, minha “maninha” como muitas vezes te chamaram, obrigada por teres sido o “meu braço direito” e por vezes “o esquerdo”. Obrigada pela tua preciosa ajuda sempre que precisei, pela permanente disponibilidade, grande amizade e pela dedicação que sempre demonstraste. Obrigada por acreditares tanto em mim, pelas tuas palavras sempre amigas em dias mais tristes e por outras sempre animadoras em dias de maior desalento. Obrigada, amiga...

Aos meus Pais agradeço tudo o que sempre me transmitiram, o amor, a educação, os valores, tudo o que me ajudou a construir a pessoa que hoje sou. Obrigada por acreditarem sempre em mim e por me fazerem sentir especial. Aos meus irmãos Cristina, Pedro e Mariana, e resto de família em especial os meus sobrinhos Francisco, Manel, Leonor e Beatriz, obrigada por me darem momentos tão felizes.

Ao Nuno e Diogo, obrigada por existirem na minha vida

Obrigada, Diogo pela fantástica capa!

Ao abrigo do Decreto-Lei nº 216/92, fazem parte integrante desta dissertação os seguintes trabalhos já publicados:

Dória S, Ramalho C. Estudo citogenético de produtos de abortamento ou tecido fetal. *Protocolos de Medicina Materno-Fetal*, 2008; pp 48.Ed. Lidel.

Dória S, Carvalho F, Ramalho C, Lima V, Francisco T, Machado AP, Brandão O, Sousa M, Matias A and Barros A. An efficient protocol for the detection of chromosomal abnormalities in spontaneous miscarriages or foetal deaths. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol*. 2009; 147:144–150.

Carvalho B, **Dória S**, Ramalho C, Brandão O, Sousa M, Matias A, Barros A, Carvalho F. Aneuploidies detection in miscarriages and foetal deaths using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification: an alternative to speeding up results? *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol*, 2010 (doi:10.1016/j.ejogrb. 2010.06.022)

Dória S, Lima V, Carvalho B, Moreira L, Sousa M, Barros A, Carvalho, F. Application of Touch FISH in the study of mosaic tetraploidy and maternal cell contamination in pregnancy losses. *J Assist Reprod Genet*, 2010 (doi: 10.1007/s 10815-010-9460-1)

Dória S, Sousa M, Fernandes S, Ramalho C, Brandão O, Matias A, Barros A, Carvalho F. Gene expression pattern of *IGF2*, *PHLDA2*, *PEG10* and *CDKN1C* imprinted genes in spontaneous miscarriages or foetal deaths. *Epigenetics*. 2010; Jul 21;5(5).

Em cumprimento do disposto no referido Decreto-Lei declara que participou activamente na recolha e estudo do material incluído em todos os trabalhos, tendo redigido os textos com a activa colaboração dos outros autores.

“Se não puderes ser um pinheiro, no topo de uma colina,
Sê um arbusto no vale mas sê
O melhor arbusto à margem do regato.
Sê um ramo, se não puderes ser uma árvore.
Se não puderes ser um ramo, sê um pouco de relva
E dá alegria a algum caminho.

Se não puderes ser uma estrada,
Sê apenas uma senda,
Se não puderes ser o Sol, sê uma estrela.
Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...
Mas sê o melhor no que quer que sejas.”

Pablo Neruda

PREFÁCIO	XV
LISTA DE ABREVIATURAS	XIX
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	5
INTRODUÇÃO.....	9
1. Abortamento espontâneo e morte fetal	13
1.1 Definição e epidemiologia	13
1.1.1 Distinção entre abortamento esporádico e recorrente.....	14
1.2 Etiologia da perda de gravidez	15
1.2.1 Causas Genéticas da perda de gravidez.....	19
1.2.1.1 Anomalias cromossômicas numéricas	20
1.2.1.2 Anomalias cromossômicas estruturais.....	27
1.2.1.3 Mosaicismo Cromossômico	31
1.2.1.4 Patologia monogénica.....	32
1.2.1.5 Outras causas genéticas	33
1.2.2 Causas não genéticas da perda de gravidez	35
1.2.2.1 Causas anatômicas	35
1.2.2.2 Causas endócrinas	35
1.2.2.3 Causas imunológicas	36
1.2.2.4 Causas Trombofílicas.....	37
1.2.2.5 Causas infecciosas	38
1.2.2.6 Causas Exógenas.....	39
1.3 Métodos de estudo da patologia cromossômica	40
2. Epigenética no contexto da perda de gravidez	42
2.1 Definição e conceitos gerais.....	42
2.2 Metilação do DNA	43
2.3 Remodelação da cromatina	44
2.4 <i>smallRNAs</i> e <i>miRNAs</i>	45
2.5 <i>Imprinting</i> Genómico	46
2.5.1 <i>Imprinting</i> Genómico no embrião.....	47
2.5.2 <i>Imprinting</i> Genómico na placenta	50
2.6 Genes <i>Imprinted</i>	52
2.6.1 <i>IGF2 (insulin-like growth factor 2)</i>	54

ÍNDICE

2.6.2 <i>PHLDA2</i> (<i>pleckstrin homology-like domain, family A, member 2, TSSC3, IPL</i>)	55
2.6.3 <i>CDKN1C</i> [<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C, p57, KIP2</i>]	56
2.6.4 <i>PEG10</i> (<i>Paternally expressed gene 10</i>)	57
OBJECTIVOS	59
PUBLICAÇÕES	63
Subcapítulo de Livro – <i>Estudo citogenético de produtos de abortamento ou tecido fetal; Parte II - Patologias da Gravidez - em Protocolos de Medicina Materno-Fetal, p.46; 2ª Edição., Lidel.</i>	65
Artigo I - <i>“An efficient protocol for the detection of chromosomal abnormalities in spontaneous miscarriages or foetal deaths.” Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2009 Dec;147(2):144-50.</i>	69
Artigo II - <i>“Aneuploidies detection in miscarriages and foetal deaths using multiplex ligation-dependent probe amplification: an alternative to speeding up results?” Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. (doi:10.1016/j.ejogrb. 2010.06.022).</i>	79
Artigo III - <i>“Application of Touch FISH in the study of mosaic tetraploidy and maternal cell contamination in pregnancy losses.” Journal of Assisted Reproduction and Genetics. (doi: 10.1007/s10815-010-9460-1).</i>	87
Artigo IV - <i>“Gene expression pattern of IGF2, PHLDA2, PEG10 and CDKN1C imprinted genes in spontaneous miscarriages or foetal deaths.” Epigenetics. 2010 Jul 21;5(5).</i>	95
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

A vida é feita de momentos, este é um deles....

Quando iniciei este trabalho, o mundo ainda não estava inundado de laboratórios que tivessem à disposição a tecnologia de *arrays* e que a aplicassem no dia a dia, nomeadamente para o diagnóstico das patologias genéticas. Os sistemas robóticos para impressão de lâminas eram ainda muito caros e poucos laboratórios tinham orçamento para esse investimento. Também não estava ainda disponível a aquisição de serviços de tecnologia de *arrays* a empresas comerciais. Assim, a forma como este trabalho foi pensado teria de ser necessariamente diferente se fosse pensado hoje, mas a ciência é assim...

Actualmente, existe já comercialmente uma série muito vasta de opções de diferentes *arrays* (DNA *microarrays*, CNV *Arrays*, aCGH, miRNA *microarrays*, *CHIP-on-chip*, etc) que permite a sua realização nos laboratórios, de uma forma relativamente simples e a um preço mais razoável. No entanto, em menos de cinco anos, os avanços tecnológicos foram de tal ordem, que até esta tecnologia pode ficar ultrapassada. As novas formas de olhar o genoma, com a *pyrosequencing*, a chamada Sequenciação de Nova Geração, chegou e veio seguramente para ficar. A possibilidade de sequenciar o genoma inteiro de um indivíduo abre-nos um mundo novo mas altera drasticamente a forma como conduzir a ciência e a investigação.

O que nos reserva o futuro? Passaremos, nós, os investigadores do laboratório para o computador? E o que faremos com tanta informação? Saberemos o que fazer com ela? Teremos nós capacidade de a compreender, de a processar e de a utilizar?

Uma boa Tese de Doutoramento deverá ser, no meu ponto de vista, não somente uma série de trabalhos científicos publicados em revistas internacionais, mas também reflectir um amadurecimento e consolidação de

PREFÁCIO

uma área de trabalho que necessariamente exige tempo. Hoje em dia, dizemos frequentemente que o tempo passa depressa. Aquilo que é um ponto de partida para um estudo terá de alcançar rapidamente o ponto de chegada, se queremos fazer ciência. Quando em 1997 entrei no Serviço de Genética não pensei logo em fazer um doutoramento. Tinha terminado o Mestrado na área da Citogenética de doenças hematológicas malignas e o objectivo era montar e desenvolver a área do Diagnóstico Citogenético de Leucemias agudas e crónicas. Posteriormente, quando em 2002 assumi o cargo de Assistente sabia que deveria iniciar, a curto prazo, um trabalho de investigação que me permitisse desenvolver e elaborar uma Tese de Doutoramento. Mas, nessa altura, ainda não era o momento certo, o Serviço tinha sofrido algumas reestruturações optando por desenvolver determinadas áreas de diagnóstico e de investigação em prol de outras, com particular interesse na área da Infertilidade Humana. Mas foi só em 2005, após algum investimento numa outra área que se tornou pouco promissora, que o tema desta Tese foi surgindo como uma área de interesse para o Serviço e para mim, em particular.

Esta tese pretendeu contribuir para o conhecimento das causas genéticas da perda de gravidez que sabemos ser um acontecimento bastante comum, mas muito perturbador. O instinto de procriar é muito mais que uma característica biológica imposta pela sobrevivência da espécie; o desejo de ter um filho é muito mais humano, afectivo e de grande carga emocional.

A maioria de nós deposita sonhos, esperanças, idealiza uma vida para os filhos, mesmo ainda antes de os ter. Por isso, quando o sonho permanece distante ou é interrompido de uma forma inesperada, tudo parece perdido. Muitos dos testemunhos que li sobre perdas de gravidez estão carregados de ansiedade, angústia e por vezes culpa, que podem em alguns casos levar a estados graves de depressão.

Espero ter conseguido, com este trabalho, ajudar a aliviar essa ansiedade e sentimento de culpa que alguns casais experimentam, identificando a causa da perda de gravidez e permitindo uma melhor orientação desses casais na procura de soluções que lhes permitam conseguir o tão desejado filho.

Dedico esta tese a todas as mulheres que já sofreram um abortamento espontâneo ou uma morte neonatal e que reuniram forças para continuar a tentar.

Sofia Dória

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ACTB</i>	<i>Actin, beta</i>
<i>AS</i>	<i>Angelman Syndrome</i>
<i>BACs</i>	<i>Bacterial Artificial Chromosomes</i>
<i>BWS</i>	<i>Beckwith-Wiedemann Syndrome</i>
<i>CDKN1C</i>	<i>Cyclin-Dependent kinase Inhibitor 1C, p57, KIP2</i>
<i>CGH</i>	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
<i>CGIs</i>	<i>Ilhas CpG</i>
<i>CpG</i>	<i>Cytosine-phosphate-Guanine</i>
<i>CTCF</i>	<i>CCCTC-binding factor</i>
<i>Der</i>	<i>Cromossoma derivativo</i>
<i>DGPI</i>	<i>Diagnóstico Genético Pré-Implantação</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<i>DNMTs</i>	<i>metiltransferases do DNA</i>
<i>DMR</i>	<i>Regiões diferencialmente metiladas</i>
<i>DUP</i>	<i>Dissomia Uniparental</i>
<i>FVL</i>	<i>Factor V de Leiden</i>
<i>FISH</i>	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
<i>GADPDH</i>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
<i>HIV</i>	<i>Vírus da imunodeficiência</i>
<i>IGF2</i>	<i>Insulin-like Growth Factor 2</i>
<i>inv</i>	<i>Inversão</i>
<i>IC</i>	<i>Centro de Imprinting</i>
<i>KCNQ1OT1</i>	<i>KCNQ1(Potassium channel, voltage-gated, KQT-like subfamily, member 1) – overlapping transcript 1</i>
<i>LOI</i>	<i>Perda de imprinting</i>
<i>Mest</i>	<i>Mesodermal Specific Transcript</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
miRNAs	micro RNAs
NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PACs	<i>P1 derived Arteficial Chromosomes</i>
PCB	Bifenilos policlorinados
PEG10	<i>Paternally Expressed Gene 10</i>
PHLDA2	<i>Pleckstrin Homology-Like Domain, family A, member 2, TSSC3, IPL</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PWS	<i>Prader-Willi Syndrome</i>
QF-PCR	<i>Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Real-Time PCR</i>
RCF	Restrição de crescimento fetal
RNA	Ácido Ribonucleico
SLC22A18	<i>Solute carrier family 22, member 18</i>
STRs	<i>Short Tandem Repeats</i>
SRS	<i>Silver-Russel Syndrome</i>
YACs	<i>Yeast Arteficial Chromosomes</i>

RESUMO

Estima-se que 10-15% de todas as gravidezes clinicamente reconhecidas terminem em abortamento espontâneo. Em 20-50% destes casos não é possível determinar a etiologia, podendo contudo atribuir-se a causas multifactoriais. As causas mais frequentemente associadas à perda de gravidez, incluem factores genéticos, anatómicos, imunológicos, metabólicos, trombofílicos, anomalias placentárias e infecções, sendo as causas genéticas consideradas as mais comuns.

Sabe-se que 50-80% dos abortamentos do primeiro trimestre apresentam anomalias cromossómicas. A maioria das anomalias correspondem a alterações numéricas, principalmente trissomias, triploidia e monossomia do cromossoma X. Adicionalmente, poderão existir outras causas genéticas, não cromossómicas, com relevância para a perda de gravidez. As alterações epigenéticas, nomeadamente as alterações do *imprinting* genómico, poderão, para alguns casos, explicar o insucesso de uma gravidez. Os genes *imprinted* desempenham um papel importante no desenvolvimento embrionário humano, actuando como genes reguladores do crescimento fetal e do desenvolvimento placentário. Apesar do interesse crescente no estudo dos genes *imprinted* humanos, o conhecimento de como estes genes actuam na regulação ou o seu papel específico no crescimento placentário, embriogénese ou em ambos, é ainda reduzido. É de referir que a maioria dos trabalhos realizados, até à data, foram feitos usando modelos animais.

O objectivo deste trabalho foi, de uma forma geral, contribuir para um melhor conhecimento dos principais factores genéticos que podem estar associados à perda de gravidez. Uma vez que as anomalias cromossómicas são consideradas as causas genéticas mais comuns, o primeiro objectivo deste trabalho foi fazer a caracterização citogenética de produtos de abortamento ou de mortes fetais, na população portuguesa, para cada um dos três trimestres de gravidez.

O estudo citogenético convencional baseado na cultura de tecidos tem algumas limitações, nomeadamente a possibilidade de falência de cultura. Deste modo, um dos objectivos deste trabalho foi desenvolver um protocolo sequencial que incluiu as técnicas de Hibridação Genómica Comparativa (CGH) e a técnica de Hibridação *In Situ* de Fluorescência (FISH)

RESUMO

em interfase, com algumas adaptações, e que foi designada de *Touch FISH*. No Artigo I, realizou-se o estudo de 232 produtos de abortamento ou de mortes fetais, obtendo-se um cariótipo em 74,6% dos casos, 38,2% dos quais com anomalias cromossómicas. Adicionalmente, nos casos com falência de cultura, a realização das técnicas de CGH e *Touch FISH* permitiu ainda detectar 19 casos com um complemento cromossómico anormal. Estes resultados permitiram-nos concluir que a aplicação deste protocolo sequencial, realizando cultura e cariótipo convencional seguido das técnicas de CGH e *Touch FISH*, foi muito útil, permitindo obter informação sobre o complemento cromossómico em todos os casos, mesmo na presença de falência de cultura. Outro dos objectivos deste projecto foi a aplicação da técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe amplification* (MLPA) ao estudo de casos de produtos de abortamento, com o intuito de detectar as aneuploidias cromossómicas mais comuns da espécie humana e comparar os resultados com o cariótipo convencional. O facto de ser uma técnica muito fidedigna e reprodutível, permitiu uma alternativa para a obtenção de resultados rápidos e em grande escala. Neste estudo (Artigo II) foram analisadas 489 amostras de DNA extraído de tecidos fetais, usando o kit comercial de MLPA (SALSA P095), para rastreio de aneuploidias dos cromossomas 13, 18, 21, X e Y. Foram detectadas 7,8% de aneuploidias, verificando-se ainda que esta técnica foi extremamente útil na identificação de casos de fetos de sexo masculino com contaminação materna.

No Artigo III, a técnica de *Touch FISH* foi realizada para avaliar a ploidia do complemento cromossómico e a presença de contaminação materna, em 328 casos de perda de gravidez, estudados previamente por cariótipo e MLPA. A técnica de *Touch FISH* confirmou em 13 casos a presença de contaminação materna e identificou dois casos com anomalias cromossómicas. Adicionalmente, e uma vez que a presença de células tetraplóides em culturas de líquido amniótico ou de tecidos provenientes de perdas de gravidez relaciona-se frequentemente com artefactos de cultura, a técnica de *Touch FISH* foi realizada, nestes casos, usando sondas centroméricas. Em 7/14 casos estudados foi confirmada a presença de uma tetraploidia verdadeira. Este trabalho permitiu concluir que o protocolo utilizado se revelou extremamente útil na distinção entre mosaicismo

verdadeiro de artefactos de cultura, podendo ainda ser utilizado para confirmação da presença de contaminação materna nos casos com discrepância de sexo entre o cariótipo e a técnica de MLPA.

Após a caracterização citogenética da população de casos de perdas de gravidez, o nosso interesse principal foi investigar outras causas genéticas, particularmente se alterações da expressão de genes *imprinted* poderiam estar associadas ao insucesso da gravidez. Foram seleccionados casos com cariótipo normal e estudaram-se quatro genes *imprinted*: dois expressos por via paterna, *IGF2* e *PEG10*, e dois expressos por via materna, *PHLDA2* e *CDKN1C*. O Artigo IV incluiu o estudo de 38 casos de produtos de abortamento ou mortes fetais, distribuídos pelos três trimestres de gravidez. A técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real foi realizada para avaliar o padrão da expressão dos genes *imprinted* anteriormente referidos. Para as perdas de gravidez do primeiro trimestre, verificou-se uma expressão aumentada apenas para o gene *PHLDA2*. No segundo trimestre, verificou-se uma expressão aumentada dos quatro genes estudados, quer nas amostras de tecido fetal quer na placenta. No terceiro trimestre, verificou-se uma redução da expressão do gene *PEG10* nas amostras de tecido fetal. Estes resultados representam um dos primeiros estudos realizados que avaliam a expressão de genes *imprinted* humanos em casos de perda de gravidez e ao longo dos três trimestres de gravidez.

Em conclusão, e uma vez que o abortamento espontâneo na população reprodutiva é um acontecimento muito comum, sendo mesmo uma das principais complicações da gravidez, torna-se muito importante reconhecer qual a sua causa, e se possível calcular o risco para uma nova gravidez.

Os resultados obtidos durante este trabalho permitiram a identificação da causa da perda de gravidez em muitos dos casos estudados e contribuíram para um aumento do conhecimento sobre a possível relação entre alterações da expressão de genes *imprinted* e a perda de gravidez.

ABSTRACT

It is estimated that about 10-15% of all clinically recognized pregnancies terminate in spontaneous miscarriages. In 20-50% of spontaneous miscarriages cases the etiology is unknown but could also be multifactorial. Frequently the causes are related to anatomical factors, thrombophilia, infections, placental anomalies, metabolic and immune disorders but genetic factors are considered the most common cause.

It is known that 50% to 80% of first trimester miscarriages show chromosomal abnormalities. Most of these abnormalities comprise numerical chromosomal aberrations, namely trisomies, triploidies and monosomy of the X chromosome. Additionally, there are other genetic causes, distinct from chromosomal abnormalities that could contribute to spontaneous human pregnancy loss. Epigenetic alterations namely disruption of genomic imprinting is one of most challenging fields and could have a main role in this issue. Imprinting genes play an important role in early human development, acting as gene regulators that control fetal growth and placental development. Despite the increased interest on human imprinted genes, little is known about imprinting gene regulation as well as their specific role in human placental growth, embryogenesis or both. It should be noted that most of the work has been done using animal models.

The aim of this work was to contribute for a better understanding of the major genetic factors that could lead to a pregnancy loss. Because chromosome abnormalities are considered the most common genetic cause, the first objective of this work was the cytogenetic characterization of spontaneous miscarriages or foetal deaths in the portuguese population, in the three trimesters of pregnancy. Conventional cytogenetic studies using tissue culture has known limitations such as culture failure and to overcome this problem we developed a sequential protocol that included Comparative Genomic Hybridization (CGH) technique and an adjusted Interphase Fluorescence in situ hybridization (FISH) that we called Touch-FISH. In the paper I, we analysed 232 spontaneous miscarriages or foetal deaths and a successful karyotype was obtained in 74,6% of the cases, 38,2% of which with an abnormal chromosomal complement. Additionally, in cases with culture failure, CGH and Touch FISH analyses revealed 19 cases with chromosomal abnormalities. The main conclusion of this paper was that

ABSTRACT

adopting the sequential protocol, conventional cytogenetics combined with CGH and Touch FISH, chromosomal complement information was available for all cases even in those with culture failure.

Other objective of this project was to apply the relatively new molecular Multiplex Ligation-dependent Probe amplification (MLPA) technique to the study of pregnancy losses cases in order to detect the more frequent chromosome aneuploidies and compare the results with the conventional karyotype. The reliability and high accuracy of this technique constitute an alternative for rapid results in a large scale testing. In this study (Paper II), 489 DNA samples from foetal tissues were analysed using the commercial MLPA kit (SALSA P095) for aneuploidy screening of chromosomes 13, 18, 21, X and Y. We detected 7,8% of chromosome aneuploidies and MLPA was really useful identifying foetal male cases with maternal contamination.

In Paper III, Touch FISH was used to evaluate the ploidy complement and sex discrepancies in 328 cases of pregnancy losses studied previously by karyotype and MLPA. Touch FISH confirmed 13 cases of maternal contamination and identified two new chromosome abnormalities. Additionally, and because the presence of tetraploid cells in cultures from amniotic fluid or from pregnancies losses is frequently associated with culture artifact, Touch FISH was performed in these cases using centromeric probes. True tetraploidy was confirmed in 7/14 cases studied. Therefore, Touch FISH protocol was extremely accurate in the distinction of genuine mosaicism from tissue culture artifacts and could also be used to confirm maternal cell contamination in cases with sex discrepancy between karyotype and MLPA.

After the cytogenetic characterization, our main interest was to investigate if other genetic causes could be involved, particularly if disruption or altered expression of human imprinted genes could be associated with pregnancy loss. Cases with normal karyotype were selected and four imprinted genes, two paternally expressed *IGF2* and *PEG10* and two maternally expressed *PHLDA2* and *CDKN1C* were studied (Paper IV). The studied was performed in 38 cases of spontaneous miscarriages or foetal deaths, from all three trimesters of pregnancy, using Quantitative Real Time PCR to evaluate gene expressions patterns of the four mentioned genes. During the first trimester only *PHLDA2* was upregulated, whereas in the

ABSTRACT

second trimester all four genes were upregulated in both foetal and placental samples. In third trimester *PEG10* was downregulated in foetal samples. These results represent one of the first studies presenting data from human imprinting gene expression in cases of pregnancies losses from all the three trimesters of pregnancy.

In conclusion, and because miscarriage in the general reproductive population is a very common occurrence and one of the major complications of pregnancy, it is very important to recognize the cause and ascertain the risk for a next pregnancy.

This study allowed the identification of the cause of the pregnancy loss, in the majority of the cases studied, and has contributed to a better understanding of the possible association between imprinting gene expression alterations and pregnancy losses.

INTRODUÇÃO



INTRODUÇÃO

Durante séculos, a morte de um feto, de uma criança durante o parto ou logo após o nascimento era considerada uma inevitabilidade da vida. A morte neonatal ou mesmo a materna era muito elevada e a intervenção médica quase inexistente. Algumas sociedades, por exemplo na China, só reconheciam uma criança como pessoa após os três meses de idade e, no Judaísmo mais tradicional, o funeral religioso só era realizado se a criança tivesse mais de trinta dias de vida.

O rápido crescimento tecnológico na área da medicina reprodutiva e obstétrica dos últimos cinquenta anos criou a figura da medicina como Deus, capaz de criar e manter a vida. A melhoria das condições de vida e a intervenção médica permitiram um decréscimo substancial na mortalidade neonatal nas últimas décadas. A descoberta de vários tratamentos eficazes que evitam o abortamento recorrente como no caso do Síndrome Antifosfolipídico é de grande importância, mas a verdade é que a intervenção médica não pode e não consegue prevenir ou impedir a maioria das perdas de gravidez.

Na verdade, a ocorrência de aneuploidias, ou seja, a existência de cromossomas a mais ou a menos em cada célula, é um acontecimento surpreendentemente comum, por razões que não são totalmente conhecidas. A maioria das aneuploidias humanas tem origem em erros meióticos de não disjunção materna, cujos ovócitos podem assim produzir embriões com apenas uma cópia de um cromossoma paterno (monossomia) ou com três cópias do mesmo cromossoma (trissomia). A maioria das aneuploidias é letal durante a vida embrionária, existindo muito poucas que poderão permitir uma gestação de termo. O principal exemplo é a trissomia do cromossoma 21 e as aneuploidias XXY e XYY. A presença de anomalias cromossômicas tem sido observada em pelo menos 50% dos abortamentos espontâneos do primeiro trimestre de gravidez, podendo mesmo ser superior se os abortamentos ocorrerem antes das 10 semanas. A análise citogenética do produto de abortamento permite uma informação valiosa no que diz respeito ao risco recorrente de anomalias cromossômicas, possibilitando um adequado aconselhamento genético, principalmente em casais com história de abortamentos de repetição. A descoberta da causa confere habitualmente um alívio psicológico aos casais, mesmo nos casos de abortamento esporádico.

INTRODUÇÃO

Até há bem pouco tempo, pensava-se que a função de um gene era determinada inteiramente pela sua sequência de DNA. O modelo clássico de hereditariedade Mendeliana assume que o efeito de um gene não depende de qual a origem parental. O modelo de *Imprinting* é uma excepção a esta regra. Hoje sabemos que a expressão génica pode ser afectada por alterações que ocorrem sobre a cadeia de DNA (epigenéticas), mas que não alteram a sua sequência. Os efeitos epigenéticos podem ser produzidos de diferentes formas, incluindo a ligação de um grupo metil a uma região particular da molécula de DNA, que causa habitualmente inactivação ou silenciamento do gene. O padrão de metilação do DNA de alguns genes é imposto durante o desenvolvimento do espermatozóide ou do ovócito e preservado durante a concepção. Estes genes irão, no entanto, estar expressos de forma diferente dependendo de serem herdados por via materna ou paterna. Apesar de não estarem descritos muitos genes *imprinted*, sabe-se que vários têm efeitos substanciais no desenvolvimento fetal e placentário. Foi por isso importante incluir nesta tese, que teve como objectivo a procura de causas genéticas que expliquem abortamentos espontâneos ou mortes fetais, o estudo de genes *imprinted* que possam estar alterados e serem a causa ou serem um factor contributivo para a perda da gravidez. Existem, actualmente poucos trabalhos sobre o estudo das alterações do *imprinting* na perda de gravidez, sendo a maioria realizados em experimentação animal. Ao contrário da primeira parte do trabalho que visa estudar as alterações cromossómicas em produtos de abortamento e mortes fetais nos três trimestres de gravidez e que para os casos estudados ficou concluída, o estudo dos 4 genes *imprinting* (*IGF2*, *PEG10*, *CDKNIC*, *PHLDA2*) desta tese é apenas uma etapa subsequente de outras investigações em curso.

1. Abortamento espontâneo e morte fetal

1.1 Definição e epidemiologia

A Organização Mundial de Saúde (OMS, 1977) definiu abortamento espontâneo como “a expulsão ou extracção de um embrião ou feto morto do útero materno com peso até 500gr”. Se o abortamento ocorrer antes das 12 semanas define-se por abortamento espontâneo precoce, e se ocorrer entre as 12 e as 20 semanas, por abortamento espontâneo tardio (Weselak et al., 2008). A perda de gravidez após as 20 semanas deverá ser denominada de nado-morto ou de morte neonatal precoce (Christiansen, 2007; Warren and Silver, 2008). No que diz respeito ainda aos abortamentos espontâneos pode ser feita uma subdivisão, com base no desenvolvimento embrionário. Assim, o período pré-embrionário incluirá a perda de gestação até à 5ª semana a partir do primeiro dia do último período menstrual. O período embrionário prolonga-se da 6ª semana até à 9ª semana. O período fetal inicia-se a partir da 10ª semana de gestação até ao fim da gestação. Todas as perdas ocorridas antes do desenvolvimento completo de um embrião podem ser designadas de perdas anembrionárias ou restos ovulares, um embrião sem batimentos cardíacos entre as 6 e 10 semanas designa-se de morte embrionária e, a partir das 10 semanas de gestação, de morte fetal. Estas distinções são importantes uma vez que a causa de perda de gravidez pode variar ao longo da gestação (Warren and Silver, 2008).

A perda de uma gravidez é provavelmente o problema médico mais comum em mulheres em idade reprodutiva. Estima-se que uma em cada quatro mulheres que pretendam engravidar irão sofrer pelo menos um abortamento espontâneo (Warren and Silver, 2008), e que pelo menos 10 a 15% do total de gravidezes clinicamente reconhecidas serão perdidas antes de atingirem o termo da gestação. Se considerarmos o total de concepções, incluindo as não clinicamente reconhecidas, cerca de 50% corresponderão a perdas espontâneas (Figura 1) (Azmanov et al., 2007; Rai and Regan, 2006; Stephenson and Kutteh, 2007).

INTRODUÇÃO

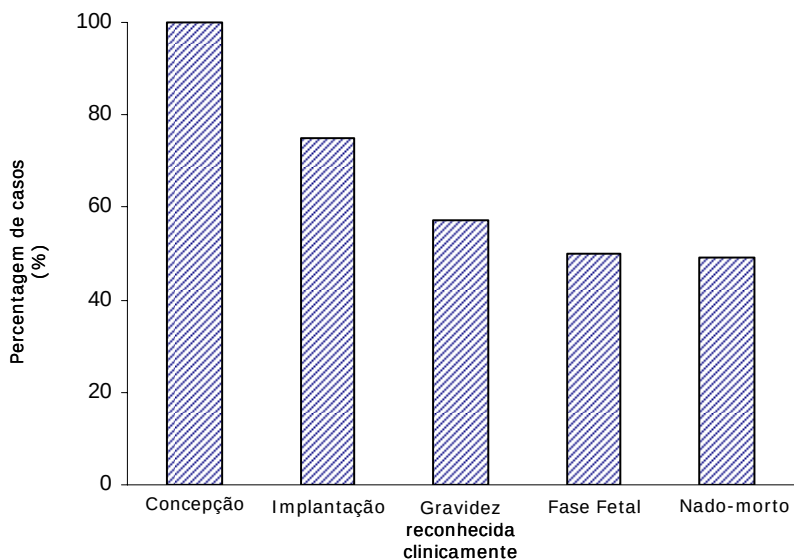


Figura 1. Número de concepções (em percentagem) teoricamente com sucesso nas diferentes fases de gestação (adaptado de Rai and Regan, 2006).

1.1.1 Distinção entre abortamento esporádico e recorrente

A maioria das perdas de gravidez é esporádica; no entanto alguns casais podem sofrer abortamentos recorrentes. Segundo a maioria dos autores e de acordo com a OMS, um abortamento recorrente define-se pela perda de 3 ou mais gravidezes consecutivas (Christiansen, 2007; Stephenson and Kutteh, 2007; Warren and Silver, 2008). Segundo a literatura, estima-se que o abortamento recorrente afecte 1-5% dos casais que pretendam uma gravidez (Carrington et al., 2005; Christiansen, 2007; Rai and Regan, 2006; Stephenson and Kutteh, 2007; Warren and Silver, 2008; Yang et al., 2006)

1.2 Etiologia da perda de gravidez

A etiologia da perda da gravidez é variegada, não sendo possível por vezes o seu esclarecimento. Entre as causas conhecidas, que podem explicar um abortamento precoce ou uma morte fetal do segundo ou terceiro trimestre de gravidez, incluem-se causas genéticas, anatómicas, trombofílicas, endócrinas, imunológicas e infecciosas. Na tabela 1 resumem-se as principais etiologias da perda de gravidez esporádica e recorrente.

Dependendo das semanas de gestação, as causas principais da perda de gravidez podem variar (Tabela 2). Assim, por exemplo, as anomalias cromossómicas são a principal causa do abortamento espontâneo precoce, enquanto que outros factores como causas anatómicas (ex. incompetência cervical) estarão mais associados a perdas de gravidez no segundo trimestre.

A maioria dos casais que sofrem um abortamento espontâneo do primeiro trimestre irá posteriormente obter uma gravidez de sucesso. No entanto, e como foi referido anteriormente, 1 a 5% irão sofrer abortamentos recorrentes, muitas vezes sem causa identificável. Na verdade, em 40 a 50% dos casais com abortamentos recorrentes não será possível identificar uma causa que explique os seus insucessos reprodutivos (Allison and Schust, 2009). Assim, enquanto a maioria dos abortamentos esporádicos estarão relacionados com aneuploidias fetais, as perdas recorrentes de gravidez poderão ter maior contributo de outras causas como estados de hipercoagulação, doenças auto-imunes, alterações endócrinas e anomalias anatómicas

INTRODUÇÃO

Tabela 1. Etiologia da perda de gravidez esporádica e recorrente.

Anomalias morfológicas/defeitos estruturais

Causas Genéticas

- Anomalias cromossômicas
- Anomalias cromossômicas equilibradas nos progenitores
- Doenças monogénicas
- Mosaicismo confinado à placenta

Causas Trombofílicas

Causas Endócrinas

- Diabetes
- Patologia da tiróide
- Patologias hormonais
- Síndrome do Ovário Policístico

Causas Ambientais

- Álcool
- Tabaco
- Drogas e químicos

Causas Imunológicas

- Síndrome Antifosfolípido
- Factores auto-imunes maternos

Causas Anatômicas

- Malformações uterinas
- Anomalias cervicais
- Miomas
- Aderências intra-uterinas

Infecções

- Virais
- Bacterianas

Adaptado de Warren and Silver (2008)

Tabela 2. Factores associados à perda de gravidez de acordo com o trimestre de gestação.

Factores				
Trimestre	Fetais	Maternos	Materno-fetais	Outros
Primeiro	Anomalias cromossómicas	Factores anatómicos (Aderências intra-uterinas, septo uterino, leiomiomas)		Abuso de drogas
		Patologia endócrina (Síndrome de Cushing, Defeitos na fase luteínica, síndrome do ovário policístico, doença da tiróide, etc)		Gravidez ectópica
	Anomalias congénitas	Factores Imunológicos (Síndrome antifosfolípido, Lupus eritematoso disseminado)		Tabaco
		Infeção (ex: Citomegalovirus, vírus do herpes simplex, <i>Listeria monocytogenes</i> , parvovirus B19, Vírus da rubéola, <i>Toxoplasma gondii</i>)		Exposição a teratogénios
		Trombofilia (activação da proteína c, Factor V de Leiden, mutação G20210A das protombinas)		Trauma
		Doença crónica não controlada (ex. diabetes, hipertensão)		
		Patologia aguda grave		
Segundo	Anomalias cromossómicas	Factores anatómicos (Incompetência cervical, aderências intra-uterinas, leiomiomata, anomalias uterinas)		Abuso de drogas
		Factores Imunológicos (Síndrome antifosfolípido, anticorpos anticardiolipinas e anticoagulantes lúpicos)		Rotura de membranas pré-termo
	Anomalias congénitas	Infeção (ex: vaginose bacteriana e infeção intra-amniótica)		Tabaco
		Problemas placentários (ex. hematomas, descolamento da placenta, placenta prévia)		Exposição a teratogénios
		Trombofilia (ex: Factor V de Leiden, deficiência da proteína S, mutação G20210A das protombinas)		Trauma
		Doença crónica não controlada (ex. diabetes, hipertensão)		
		Patologia aguda grave		
Terceiro	Anomalias cromossómicas	Factores Imunológicos (Síndrome antifosfolípido, anticorpos anticardiolipinas e anticoagulantes lúpicos)	Restrição de crescimento fetal	Abuso de drogas
		Infeção	Transfusão materno-fetal	Tabaco
	Anomalias congénitas	Problemas placentários (ex: descolamento da placenta, placenta prévia)	Síndrome de transfusão feto-fetal	Exposição a teratogénios
		Asfixia intra-parto	Hidrópsia fetal não imune	Trauma
		Gravidez de pós-termo	Isoimunização	
		Trombofilia (ex: Factor V de Leiden, deficiência da proteína S, mutação G20210A das protombinas)		
		Complicações do cordão umbilical		
		Doença crónica não controlada (ex. diabetes, hipertensão)		
	Patologia aguda grave			

Adaptado de Michels and Tiu, 2007.

INTRODUÇÃO

Classicamente, e como foi referido anteriormente a perda de gravidez recorrente é definida como a perda de pelo menos 3 gestações, não sendo totalmente consensual se terão ou não de ser consecutivas. Num estudo recente, van den Boogaard e colaboradores (2010) compararam se a história de abortamentos consecutivos versus não consecutivos em casais com dois ou mais abortamentos contribuiria para uma maior probabilidade dos casais serem portadores de uma anomalia cromossómica. Estes autores concluíram que não havia diferenças e que as perdas de gravidez consecutivas não seriam por si só um factor de risco (van den Boogaard et al., 2010)

Devido à elevada frequência de abortamentos espontâneos e à elevada proporção de casos que ficam sem causa identificada (cerca de 40-50%), a questão de quando deverá ser iniciada a investigação da causa é frequentemente assunto de controvérsia. Allison e Schust, num artigo de opinião publicado em 2009, fazem a revisão dos conceitos e das causas do abortamento recorrente do primeiro trimestre de gravidez, defendendo o início da investigação sobre a causa do abortamento logo após o segundo abortamento (Allison and Schust, 2009). Num estudo retrospectivo em 1020 mulheres, Jaslow e colaboradores procuraram determinar as causas dos abortamentos após 2, 3, 4 ou mais perdas de gravidez. Realizaram uma avaliação extensa, incluindo cariótipo de ambos os progenitores e rastreio das causas mais frequentes de abortamentos recorrentes incluindo causas anatómicas, endócrinas e imunológicas. Os autores concluíram que 40% das mulheres testadas apresentavam pelo menos um dos testes anormal, sendo que a prevalência encontrada foi semelhante entre mulheres com 2, 3, 4 ou mais abortamentos de repetição, o que seria a favor do início do estudo de investigação logo após o segundo abortamento (Jaslow et al., 2010). O facto de se oferecer um estudo das causas de abortamento poderá minimizar também o impacto psicológico de uma terceira gravidez sem sucesso.

Como referimos, em cerca de metade das mulheres com abortamentos recorrentes poderá não ser identificada uma causa para as perdas fetais. Um acompanhamento psicológico poderá em muitas das situações ser necessário uma vez que a perda recorrente de gravidez poderá conduzir a estados depressivos.

1.2.1 Causas genéticas da perda de gravidez

A concepção humana constitui um processo bastante vulnerável mas muito eficaz. É vulnerável na medida em que uma grande proporção de todas as concepções humanas é cromossomicamente anormal, com uma grande percentagem de casos resultando em perda espontânea da gravidez. É muito eficaz porque em cerca de 99% das vezes uma gravidez de termo resulta num recém-nascido cromossomicamente normal. Assim, menos de 1% dos recém-nascidos são portadores de um desequilíbrio cromossômico (Tabela 3) o que de acordo com o esquema em iceberg (Figura 2), torna o nascimento de uma criança com cariótipo anormal um acontecimento extraordinário (Gardner and Sutherland, 2004).

Tabela 3 - Frequência de anomalias cromossômicas em recém-nascidos.

Anomalias Cromossômicas	Freq	Total Freq
Trissomias autossômicas		
13	0,08	
18	0,15	1,43
21	1,2	
Triploidia		0,02
Aneuploidias dos cromossomas sexuais		
XXY	1,2	
XYY	1	2,35
outras	0,15	
45,X	0,4	
XXX	1	1,4
Rearranjo estrutural desequilibrado		0,7
Total de desequilíbrios cromossômicos		5,9
Rearranjos estruturais equilibrados		
Translocações recíprocas	2,5	
Translocações Robertsonianas	1	
Inversões pericêntricas	0,8	4,3
Total de anomalias cromossômicas		10,2
		(1 em 98)

Fonte : (Emery and Rimoin, 2002; Gardner and Sutherland, 2004)

INTRODUÇÃO

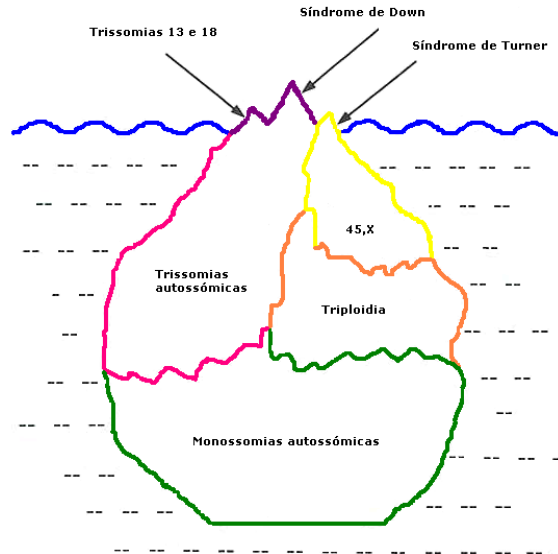


Figura 2. Esquema em *iceberg* representativa da perda de gravidez de causa cromossômica. Adaptado de Gardner and Sutherland, 2004.

1.2.1.1 Anomalias cromossômicas numéricas

As anomalias cromossômicas são a causa mais comum de abortamento espontâneo. Segundo a literatura cerca de 56% das anomalias citogenéticas presentes em abortamentos espontâneos corresponderão a trissomias, 20% a poliploidias, 18% a monossomias do cromossoma X e cerca de 4% a alterações estruturais (Stephenson and Kutteh, 2007; Warren and Silver, 2008).

Trissomias

As trissomias autossômicas surgem tipicamente *de novo*, devido a erros de não disjunção meiótica durante a gametogênese. Os cariótipos dos progenitores são, na maioria destes casos, normais, conferindo um risco mínimo de recorrência.

Dentro das trissomias associadas ao abortamento espontâneo, a trissomia do cromossoma 16 é a mais comum correspondendo a 20-30% do

INTRODUÇÃO

total de trissomias observadas em produtos de abortamento, seguida dos cromossomas 22, 21, 15 e 13 (Goddijn and Leschot, 2000; Simpson and Bombard, 1987; Stephenson and Kutteh, 2007; Warren and Silver, 2008).

A grande maioria das concepções trissômicas termina em abortamento espontâneo. A exceção ocorre para as trissomias que envolvem os cromossomas sexuais (que são mais toleradas pela espécie humana) e para as trissomias dos cromossomas 21, 18 e 13, que são as habitualmente observadas em recém-nascidos com malformações, e que apresentam uma taxa de sobrevivência ao nascimento de cerca de 22%, 5% e 3%, respectivamente (Stephenson and Kutteh, 2007). As trissomias dos cromossomas sexuais 47,XXX, 47,XXY e 47, XYY têm uma frequência de cerca de 1/1000 gestações de termo. A maioria dos indivíduos afectados apresenta geralmente poucas dismorfias, o que faz com que muitos destes não sejam identificados sem a realização de um estudo citogenético. A expressão fenotípica muito atenuada ao nascimento reflecte muito provavelmente a ausência de um efeito muito deletério durante a embriogénese, o que poderá explicar uma frequência de apenas 0,2% de trissomias heterossômicas em produtos de abortamento (Pflueger, 2005).

A proporção de cariótipos anormais em produtos de abortamento é inversamente proporcional à idade gestacional. Assim, segundo a literatura a proporção de produtos de abortamento com anomalias cromossômicas atingirá os 90% em espécimes anembrionárias (restos ovulares), aproximadamente 50% em abortamentos ocorridos entre as 8 e 11 semanas de gravidez e cerca de 30% para gestações entre as 16 e 19 semanas. Nas mortes neonatais, a proporção de casos com anomalias cromossômicas pode variar entre 6 a 12%, com menor probabilidade à medida que se aproxima o término da gestação (Benkhalifa et al., 2005; Stephenson and Kutteh, 2007; Wapner and Lewis, 2002; Warren and Silver, 2008). A frequência de anomalias cromossômicas é ainda influenciada por outros factores tal como a presença de malformações fetais, restrição de crescimento fetal (RCF) e idade materna. Assim, segundo a literatura, 2/3 dos embriões e 1/3 dos fetos malformados terão cariótipo anormal (Byrne et al., 1985).

A análise citogenética do segundo e de subsequentes produtos de abortamento fornece uma informação importante para o clínico e para a

INTRODUÇÃO

paciente. Na população reprodutiva em geral, a ocorrência de um abortamento trissômico não parece aumentar o risco de um segundo abortamento (Warburton et al., 1987). Na verdade, as trissomias são habitualmente acontecimentos esporádicos; no entanto, a sua frequência aumenta marcadamente com a idade materna (Hassold and Chiu, 1985).

A idade materna correlaciona-se positivamente com erros em meiose I que se sabe ser a explicação mais comum para o aparecimento de trissomias. A proporção de trissomias que surgem a partir de erros de meiose I em oposição à meiose II varia entre as diferentes aneuploidias. Virtualmente, todas as trissomias do cromossoma 16 têm origem materna e derivam de erros em meiose I, enquanto que erros na meiose II são extremamente comuns para o caso da trissomia 18, o que poderá reflectir diferenças individuais na arquitectura genómica de cada cromossoma (Hassold et al., 2007; Hassold et al., 1995). Adicionalmente, erros da meiose materna correlacionam-se com a redução ou ausência de recombinação génica (Hassold et al., 2007; Simpson, 2007). Na verdade, para além da idade materna, a alteração da recombinação génica é o outro único factor etiológico conhecido importante associado às trissomias humanas. Este efeito é atribuído, na maioria das vezes, ao par de cromossomas homólogos que falham o *crossing-over*; neste caso, é esperado ocorrer segregação ao acaso em metafase I e consequentemente um risco de 50% de não-disjunção. Recentemente, foram publicados uma série de estudos sobre esta matéria. Sherman e colaboradores, evidenciaram com os seus estudos, pelo menos para o caso da trissomia 21, que a associação entre recombinação e não disjunção é complexa, verificando-se diferentes mecanismos de não-disjunção, como falhas de crossing-over, ocorrência de locais de recombinação muito próximos ou muito distantes do centrómero e ainda outros, que não envolvendo o processo de recombinação, são resultantes de anomalias no processo meiótico (Hassold et al., 2007; Sherman et al., 2006).

Trissomias duplas

A frequência das trissomias duplas nos produtos de abortamento é mais elevada do que a esperada só pelo acaso. Segundo a literatura, a prevalência de trissomias duplas encontradas em produtos de abortamento é de 0,21-2,8% (Diego-Alvarez et al., 2006). O primeiro caso descrito na literatura foi em 1959, quando Ford e colaboradores apresentaram um caso de um paciente com cariótipo 47,XXY,+21 (Ford et al., 1959). Desde então, cerca de 385 casos de nado-mortos ou de produtos de abortamento foram descritos na literatura (Diego-Alvarez et al., 2006; Menasha et al., 2005; Micale et al., 2010).

A idade gestacional média das concepções com trissomia dupla descrita é significativamente mais baixa do que a das concepções trissômicas simples. No entanto, as combinações de trissomias duplas que envolvem cromossomas compatíveis com gestações de termo (cromossomas 13, 18, 21, X e Y) terão maior probabilidade de sobrevivência até gestações mais tardias. Em nados-mortos, usualmente um dos cromossomas adicionais é um X sendo o outro um 13, 18 ou 21 (Diego-Alvarez et al., 2006; Micale et al., 2010; Simpson, 2007). A idade materna correlaciona-se também positivamente com a presença de trissomia dupla, uma vez que se verificou estar significativamente aumentada nos casos de trissomia dupla em comparação com a das trissomias simples (Diego-Alvarez et al., 2006; Micale et al., 2010).

A realização de um estudo multicêntrico permitiu verificar que a combinação de trissomia dupla mais frequentemente encontrada foi a dos cromossomas 16+21, seguida das combinações 15+16, 15+21, 18+21 e 21+22. Os autossomas mais vezes envolvidos foram por ordem decrescente os cromossomas 21, 16, 18, 15, 22, 13, enquanto que o envolvimento dos cromossomas 1 e 19 nunca foi observado (Tabela 4) (Micale et al., 2010).

Tabela 4. Cromossomas envolvidos em trissomias duplas observados em produtos de abortamento.

Cromossomas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X/Y
Nº de casos	0	31	5	12	7	5	21	36	12	13	5	9	39	29	62	81	5	77	0	32	134	54	101

Adaptado de Micale et al., 2010.

INTRODUÇÃO

Monossomias

A grande maioria das concepções com monossomia do cromossoma X termina em abortamento, com uma sobrevivência para as gestações de termo inferior a 1% (Pflueger, 2005). A monossomia do cromossoma X é assim uma das alterações mais frequentemente detectadas em produtos de abortamentos com uma frequência de cerca de 18% do total de anomalias encontradas (Stephenson and Kutteh, 2007; Warren and Silver, 2008). A frequência de indivíduos do sexo feminino portadores de Síndrome de Turner (45,X) é aproximadamente de 1/2500 (Allanson and Graham in Emery and Rimoin's, 2002). Não foram descritos cariótipos 45,Y, o que se pode considerar expectável dado o conteúdo vital em genes existente no cromossoma X.

A monossomia X ocorre em cerca de 80% dos casos como resultado de erros de não-disjunção paterna (Hassold and Hunt, 2001) e ao contrário da maioria das trissomias o risco não aumenta com a idade materna (Hassold and Chiu, 1985; Robinson et al., 2001).

As monossomias autossómicas são extremamente raras, pensando-se que a perda da gravidez ocorrerá antes da fase de implantação, não havendo na maioria das vezes, reconhecimento clínico da gravidez (Simpson, 2007). Goddijn e Leschot (2000) fizeram a revisão de mais de 10 estudos citogenéticos realizados entre 1987 e 1998, que incluíram ao todo 4696 produtos de abortamento. Nesta série, foram encontrados apenas 5 casos com monossomias autossómicas num total de 2319 casos (0,2%) com anomalias cromossómicas (Goddijn and Leschot, 2000).

Poliploidias

As poliploidias são alterações numéricas em que há alteração do número de todo um complemento cromossómico. Em caso de presença de três complementos cromossómicos ($3n=69$ cromossomas) denomina-se de triploidia; em caso de presença do dobro do complemento dissómico ($4n=92$ cromossomas) denomina-se de tetraploidia. Segundo a literatura, estima-se que cerca de 1% de todas as concepções humanas sejam triplóides e que, cerca de

INTRODUÇÃO

18% dos produtos de abortamento com cariótipo anormal correspondam a casos com triploidia (Warren and Silver, 2008).

A maioria das concepções triplóides culmina em abortamento espontâneo precoce, mas ocasionalmente verifica-se o desenvolvimento de um feto ou a ocorrência de uma gestação de termo. As triploidias podem ser resultantes de um complemento haplóide extra de origem materna (digínico) ou de origem paterna (diândrico). Em 50-60% dos abortamentos precoces a origem do complemento extra é paterna, no entanto, em abortamentos com menos de 8,5 semanas a origem do complemento extra é predominantemente materno e sempre que estiver presente um embrião ou feto. Por outro lado, em casos com idade gestacional superior a 8,5 semanas e não identificação de feto ou embrião, a presença de um complemento extra de origem paterna é mais comum (McFadden and Langlois, 2000; Zaragoza et al., 2000).

Um triploidia de origem paterna pode resultar da fertilização de um ovócito haplóide normal por dois espermatozóides (dispermia) ou por um espermatozóide diplóide. Outro mecanismo possível é a fertilização de ovócito normal por um espermatozóide haplóide com subsequente endoreplicação de apenas o complemento cromossômico paterno. Este processo vai resultar numa isodissomia de todos os cromossomas paternos, devido a erros em meiose II. As triploidias de origem materna têm origem, a maioria das vezes, em erros de meiose I e II, resultando num ovócito diplóide (Pflueger, 2005).

Segundo a literatura, a maioria das concepções triplóides de origem paterna abortam entre as 10 e as 20 semanas de gestação, enquanto que as de origem materna ou são perdidas muito precocemente durante a vida embrionária ou sobrevivem até idades gestacionais mais tardias com o desenvolvimento de um feto (Zaragoza et al., 2000).

De acordo com a origem parental o fenótipo observado em fetos triplóides é bastante distinto. O fenótipo diândrico é caracterizado pela presença de um feto de tamanho normal ou com algum atraso de crescimento mas relativamente simétrico, por uma placenta cística anormalmente grande e com características histológicas compatíveis com uma mola hidatiforme parcial. O fenótipo digínico caracteriza-se pela presença de um feto com atraso de crescimento muito acentuado e marcadamente assimétrico e por uma placenta geralmente pequena sem características de mola (McFadden and Robinson,

INTRODUÇÃO

2006). A existência do efeito de *imprinting* é um dos mecanismos que justifica as diferenças observadas entre as triploidias de origem materna e as de origem paterna (McFadden et al., 1993).

Os fetos triplóides podem apresentar uma série de anomalias congénitas como sindactilia dos dedos dos pés ou mãos, anomalias do tracto urinário, anomalias genitais, cardíacas e cerebrais, não havendo, no entanto, marcadas diferenças entre os fetos triplóides diândricos ou digínicos. Este facto sugeriu que o efeito da origem parental do complemento cromossómico extra deverá ter um papel mais relevante no fenótipo e função da placenta do que propriamente no feto (McFadden and Robinson, 2006).

A presença de tetraploidia num produto de abortamento é um acontecimento menos comum que uma triploidia, sendo a maioria detectada precocemente, com 2 a 3 semanas de vida embrionária. Uma gestação de termo tetraploide é um fenómeno extremamente raro e que quando descrito é habitualmente em mosaico (46,XX/92,XXXX ou 92,XXYY) (Sharma et al., 2009; Simpson, 2007).

Aneuploidias Recorrentes

Durante o primeiro trimestre de gravidez, a frequência de aneuploidias recorrentes é mais elevada do que a esperada pelo acaso. No entanto, nem sempre existe consenso na comunidade científica sobre qual o grau de contribuição das aneuploidias para os abortamentos recorrentes. Bianco e colaboradores estudaram o cariótipo fetal em 46029 mulheres que realizaram diagnóstico pré-natal. A prevalência de aneuploidias encontradas aumentou progressivamente nos casos com abortamentos anteriores e à medida que o número de abortamentos aumentava: 1,39% para os casos sem abortamentos anteriores, 1,67% após um abortamento, 1,84% após dois abortamentos e 2,18% após três abortamentos (Bianco et al., 2006). A presença de embriões com maior taxa de aneuploidias em casais com abortamentos recorrentes (71%) comparativamente aos embriões de casais que recorreram a Diagnóstico Genético Pré-Implantação (DGPI) para doenças monogénicas (45%), parece ser também indicativo de um mecanismo compatível com a existência de

INTRODUÇÃO

aneuploidias recorrentes (Rubio et al., 2003). Também, Munné e colaboradores fizeram um estudo semelhante para os mesmos dois grupos mas entraram ainda em conta com o factor idade materna e encontraram taxas de 37% versus 21% em mulheres com menos de 35 anos e 34% versus 31,5% em mulheres com mais de 35 anos (Munne et al., 2004). Estes estudos sugerem que para além das situações esporádicas poderá existir um mecanismo de recorrência de aneuploidias em casais com abortamentos recorrentes.

1.2.1.2 Anomalias cromossómicas estruturais

As anomalias cromossómicas estruturais incluem translocações, inversões, deleções e duplicações. Ocorrem em cerca de 4% dos casos de abortamento com cariótipo anormal, sendo que em metade dos casos têm origem *de novo* e a outra metade é herdada a partir de uma translocação equilibrada ou de uma inversão presente num dos progenitores (Simpson and Bombard, 1987; Stephenson and Kutteh, 2007).

Translocações Recíprocas

Uma translocação recíproca define-se pela troca de segmentos cromossómicos entre cromossomas não homólogos, sem perda nem ganho de material, ou seja de uma forma equilibrada.

Cerca de 4-5% dos casais com abortamentos recorrentes são portadores de translocações equilibradas (De Braekeleer and Dao, 1990; Simpson, 2007; Simpson et al., 1981). Estes indivíduos são fenotipicamente normais mas a sua descendência tem um risco aumentado de segregações desequilibradas. A frequência de translocações equilibradas nos casais com abortamentos recorrentes é mais elevada nas mulheres que nos homens ou se existir história prévia de uma morte neonatal ou do nascimento de uma criança com malformações (De Braekeleer and Dao, 1990). Cerca de 60% das translocações equilibradas são recíprocas (troca de segmentos entre cromossomas não homólogos) e 40% são translocações Robertsonianas (quando ocorre fusão

INTRODUÇÃO

cêntrica entre dois cromossomas acrocêntricos: 13, 14, 15, 21 ou 22) (Figura 3).

Quando um dos progenitores é portador de uma anomalia estrutural equilibrada, de uma gravidez podem resultar três tipos de situações: nascimento de uma criança com cariótipo normal, nascimento de uma criança com a anomalia estrutural equilibrada (inversão ou translocação) igual à do progenitor ou uma concepção portadora de uma segregação desequilibrada (com deleções/duplicações ou trissomias/monossomias). Esta situação pode levar a um abortamento espontâneo, morte neonatal ou ao nascimento de uma criança com malformações congénitas e/ou atraso mental (5-10%) (Goddijn and Leschot, 2000). A regra é quanto maior for o segmento cromossômico envolvido maior é a probabilidade de ocorrer um abortamento espontâneo e menor o risco de nascimento de uma criança com Síndrome Polimalformativo e/ou atraso mental.

Translocações Robertsonianas

Em algumas situações de abortamentos recorrentes um dos progenitores pode ser portador de uma translocação Robertsoniana. As translocações Robertsonianas que envolvem os cromossomas 14 e 21 são as mais importantes em termos de frequência e risco genético para a descendência, sendo o risco teórico de nascimento de uma criança com Síndrome de Down de cerca de 33%. No entanto, o risco empírico é bastante menor devido à letalidade da maioria das concepções, havendo diferenças muito significativas entre o progenitor feminino e o masculino. Assim, segundo a literatura, o risco estimado para nascimento de uma criança com Síndrome de Down é de cerca de 1% se a translocação for de origem paterna e de cerca de 10% se for de origem materna (Boue and Gallano, 1984; Gardner and Sutherland, 2004). As translocações Robertsonianas envolvendo outros cromossomas têm riscos empíricos bastante menores. Na translocação rob(13;14) o risco de nascimento de uma criança com trissomia 13 é inferior a 1%, reflectindo a letalidade da maioria dos produtos de segregação (Simpson, 2007). É de referir ainda um tipo excepcional de translocação Robertsoniana

INTRODUÇÃO

que tem um risco de transmissão de trissomias à descendência de quase 100%. Este tipo de translocação envolve a fusão de dois cromossomas acrocêntricos homólogos [ex. rob(21;21) ou rob(13;13)], e só no caso de ocorrer fecundação com um gameta nulissômico para o cromossoma envolvido será possível repor o complemento correcto de cromossomas.

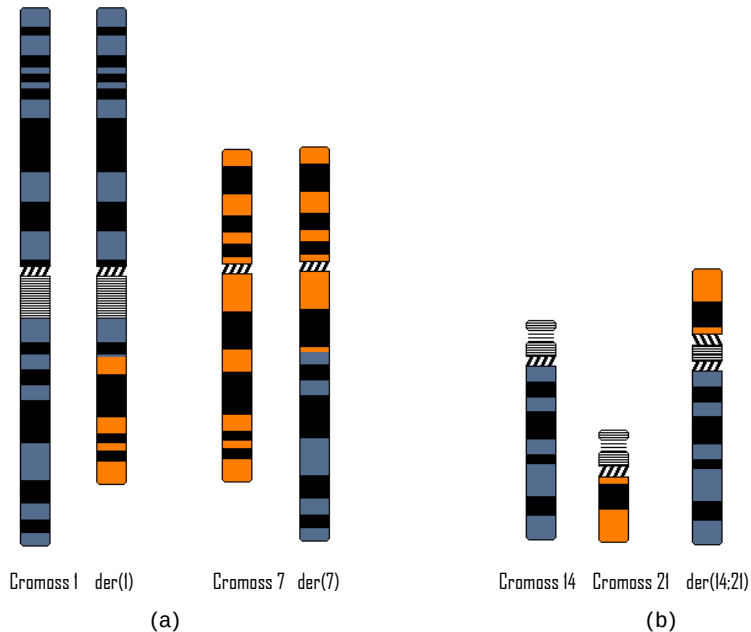


Figura 3. (a) Esquema de uma translocação recíproca equilibrada; (b) Esquema de uma translocação Robertsoniana.

Inversões

As inversões cromossômicas (implicam duas quebras num cromossoma e subsequente rotação do segmento interno aos dois pontos de quebra) são menos frequentemente associadas ao abortamento recorrente do que as translocações, estimando-se uma frequência inferior a 1% (Simpson, 2007). Se a inversão envolver o centrómero denomina-se de pericêntrica; se ocorrer no mesmo braço denomina-se de paracêntrica (Figura 4).

INTRODUÇÃO

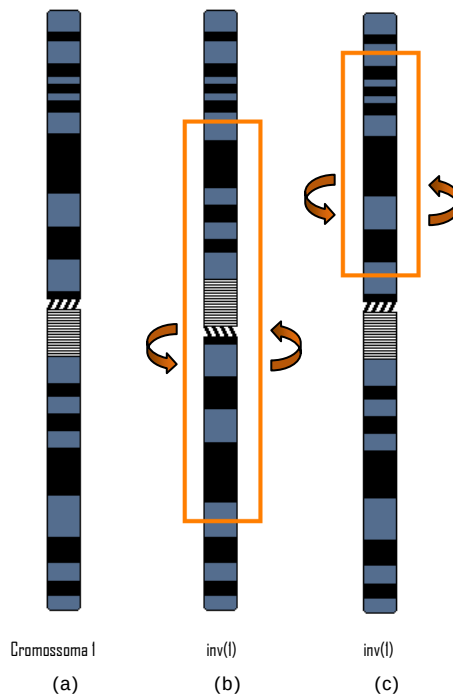


Figura 4. Esquema de uma inversão cromossômica; (a) cromossoma normal, (b) inversão pericêntrica; (c) inversão paracêntrica.

O risco de descendência com uma segregação anormal depende do tamanho, do local da inversão e de qual o progenitor afetado. Tal como no caso das translocações, o risco de descendência cromossomicamente anormal é maior no caso do portador ser o progenitor feminino, estimando-se um risco para as inversões pericêntricas de 7% se o progenitor for feminino e de 5% no caso do progenitor ser masculino (Branch and Heuser, 2010; Gardner and Sutherland, 2004). No caso das inversões que envolvem porções pequenas de segmentos cromossômicos, a ocorrência de *crossing over* no local da inversão origina habitualmente, deleções ou duplicações grandes geralmente letais. Paradoxalmente, inversões envolvendo grande parte do cromossoma (30-60% do total de comprimento do cromossoma) poderão ser mais compatíveis com gestações de termo compatíveis com a vida. Teoricamente, para as inversões paracêntricas, o risco de nascimento de um recém-nascido com malformações congénitas e/ou atraso mental é menor do que nas inversões pericêntricas, uma

vez que a maioria dos recombinantes originados a partir das inversões paracêntricas são letais.

1.2.1.3 Mosaicismo cromossômico

Mosaicismo significa a presença de duas ou mais linhas celulares cromossomicamente diferentes no mesmo indivíduo. Dependendo do momento em que ocorreu a alteração, isto é, prévia ou posteriormente à diferenciação dos compartimentos embrionários ou coriônicos, o mosaicismo pode estar presente na placenta e no embrião ou confinado apenas a um deles. O mosaicismo confinado à placenta (MCP) é um tipo de mosaicismo que é específico de um tecido envolvendo a identificação de uma linha celular aneuplóide, que neste caso apenas estará presente na placenta e ausente no feto (Kalousek and Vekemans, 1996). Estes casos de discrepâncias fetoplacentárias têm sido descritos em 1-2% de amostras provenientes de biópsias das vilosidades coriônicas (BVC) (Farra et al., 2000; Ledbetter et al., 1992) e também em produtos de abortamentos e placentas de termo (Stetten et al., 2004).

Na maioria das vezes o mosaicismo detectado em BVC é confinado à placenta, no entanto, em 10-20% dos casos, a linha celular anormal isolada ou em mosaicismo é encontrada no feto (Hahnemann and Vejerslev, 1997; Smith et al., 1999; Stetten et al., 2004). Adicionalmente, existe ainda a possibilidade de dissomia uniparental (DUP) no feto (presença de dois cromossomas homólogos com a mesma origem parental), resultante de um mecanismo de *trisomy rescue* a partir de uma linha celular aneuplóide (trissômica) na placenta (Figura 5) (Engel and DeLozier-Blanchet, 1991; Kalousek and Vekemans, 2000; Kotzot, 1999).

Diferentes tipos de mosaicismo poderão ter implicações na perda fetal, incluindo a possibilidade das anomalias cromossômicas estarem limitadas à placenta com uma completa dicotomia entre placenta e feto. Este tipo de mosaicismo foi encontrado em 2/141 (1,4%) produtos de abortamento estudados (Kalousek et al., 1991; Qumsiyeh, 1998). Outro tipo de mosaicismo possível é, como já foi referido anteriormente, o mosaicismo confinado à

INTRODUÇÃO

placenta, com ambas as linhas celulares representadas na placenta. Este tipo de mosaicismo foi encontrado em 10/54 (19%) dos produtos de abortamento, enquanto que o outro tipo de mosaicismo confinado apenas ao embrião/feto foi encontrado em 1/54 (2%) produtos de abortamentos estudados (Kalousek et al., 1992). Por outro lado, a existência de mosaicismo pode ser um mecanismo favorável a um aumento da sobrevivência fetal, uma vez que foram descritas linhas celulares normais confinadas à placenta em gestações tardias de fetos portadores de trissomias dos cromossomas 13 e 18. A presença de células normais na placenta supõe-se que seja um mecanismo que favoreça a sobrevivência gestacional (Kalousek et al., 1989).

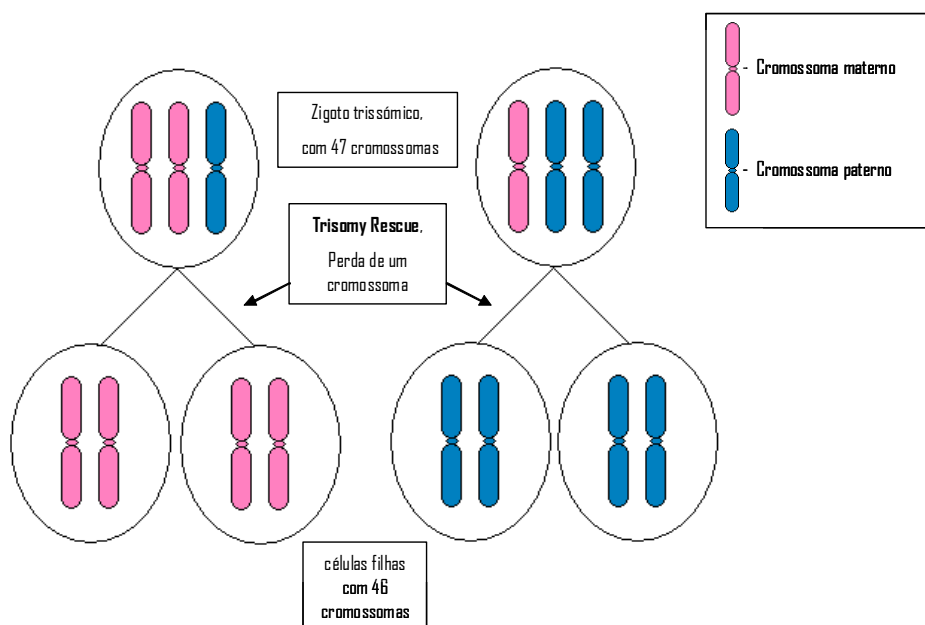


Figura 5 – Esquema do mecanismo de *Trisomy Rescue*.

1.2.1.4 Patologia monogénica

Para além da patologia cromossômica que pode explicar (pelo menos para o primeiro trimestre de gravidez) cerca de 50% dos abortamentos espontâneos, outras causas genéticas poderão explicar o abortamento de repetição, como o

caso das patologias monogénicas. Algumas destas, foram já associadas à perda recorrente de gravidez, como a distrofia miotónica, algumas displasias esqueléticas letais como a displasia tanatofórica, a osteogénese imperfeita tipo II e o Síndrome de Rett (Byrne and Ward, 1994; Suthers, 1996).

1.2.1.5 Outras causas genéticas

Na etiologia do abortamento espontâneo será ainda de considerar as patologias multifactoriais, a presença de anomalias cromossómicas nos espermatozóides e o processo de inactivação do cromossoma X. Nas patologias multifactoriais o mecanismo genético é resultante de mutações ou variações génicas em vários *loci* e em combinação com factores ambientais. Os defeitos do tubo neural são exemplos de patologias multifactoriais que poderão causar um abortamento espontâneo ou morte neonatal. A deficiência em ácido fólico é um dos factores ambientais conhecidos com estreita associação às patologias dos defeitos do tubo neural. A incidência de defeitos do tubo neural é cerca de dez vezes superior em abortamentos espontâneos do que em nados-vivos (McFadden and Kalousek, 1989).

A avaliação genética num caso de abortamentos recorrentes consiste habitualmente no estudo citogenético do produto de abortamento e/ou na realização de cariótipo no sangue periférico dos progenitores. Mais recentemente, os investigadores perceberam que a presença de anomalias cromossómicas nos espermatozóides, nomeadamente aneuploidias, poderia ter também um papel significativo na perda recorrente de gravidez. Os estudos citogenéticos em espermatozóides permitiram verificar que as anomalias cromossómicas são relativamente frequentes mesmo em homens normais (Brandriff et al., 1985). Estudos em casais com abortamentos recorrentes demonstraram um aumento da incidência de aneuploidias nos espermatozóides dos homens estudados (Al-Hassan et al., 2005; Bernardini et al., 2004; Carrell et al., 2003). Assim, em situações de abortamentos recorrentes de causa idiopática, a realização do estudo cromossómico dos espermatozóides permite avaliar a contribuição do factor masculino e estabelecer em alguns casos um prognóstico reproductivo e mesmo recomendar um diagnóstico genético pré-

INTRODUÇÃO

implantação em caso de ser detectada uma incidência elevada de anomalias cromossômicas nos espermatozóides.

Outro mecanismo possível que pode também ter um contributo para o abortamento espontâneo é o processo de inactivação do cromossoma X. A inactivação do cromossoma X ocorre habitualmente ao acaso, podendo estar inactivo o cromossoma X paterno ou o materno e ocorrendo este processo aleatório numa fase ainda muito precoce da vida embrionária. Excepcionalmente, podem ocorrer desvios ao processo de inactivação ao acaso, verificando-se a inactivação preferencial de um dos cromossomas (paterno ou materno) em relação ao outro. A detecção de um caso com desvio total ao processo de inactivação do cromossoma X numa família com elevada taxa de abortamentos recorrentes sugeriu que esta condição poderia ter alguma importância como mais uma possível causa para o abortamento recorrente (Lanasa et al., 1999; Pegoraro et al., 1997). Um dos mecanismos propostos sugeria a ocorrência de letalidade selectiva das concepções masculinas que herdassem o cromossoma X anormal. Desde essa altura, foram publicados vários trabalhos que procuraram estabelecer uma relação entre anomalias no processo de inactivação do cromossoma X e o abortamento recorrente. Os resultados obtidos têm sido bastante contraditórios, verificando-se nuns trabalhos uma indicação para a associação entre as duas situações e noutros uma ausência aparente de qualquer tipo de relação (Bagislar et al., 2006; Beever et al., 2003; Hogge et al., 2007; Pasquier et al., 2007; Sullivan et al., 2003).

Para além das alterações cromossômicas ou génicas, outras alterações denominadas epigenéticas poderão ter também uma contribuição significativa na etiologia do abortamento espontâneo. A possibilidade da interferência de mecanismos epigenéticos no abortamento espontâneo é um assunto que será abordado no ponto 2 da Introdução.

1.2.2 Causas não genéticas da perda de gravidez

1.2.2.1 Causas anatômicas

A presença de septo uterino tem sido associado a história de abortamento recorrente precoce, enquanto que a presença de anomalias mullerianas, como um útero bicórneo e/ou unicórneo, está associada a perdas mais tardias, no segundo trimestre de gravidez ou na fase pré-termo (Lin, 2004). A frequência destas anomalias uterinas é desconhecida para a população em geral, no entanto, em mulheres com abortamentos recorrentes têm sido descritas frequências variáveis entre 1,8% e 37,6% (Braude et al., 2002; Philipp et al., 2003; Woelfer et al., 2001).

Insuficiência ou incompetência cervical é outra das causas associadas à perda de gravidez no segundo trimestre, ocorrendo tipicamente rotura de membranas, contracções e expulsão prematura do feto (Michels and Tiu, 2007).

1.2.2.2 Causas endócrinas

Logo após a implantação, a manutenção de uma gravidez está dependente de uma série de eventos endócrinos que favorecem um crescimento e desenvolvimento fetal com sucesso. Apesar da maioria das mulheres grávidas não apresentar alterações endócrinas prévias à gravidez, algumas poderão desenvolvê-las, podendo esta situação aumentar o risco de perda de gravidez.

Estima-se que 8-12% de todas as perdas de gravidez possam resultar de alterações endócrinas (Luisi et al., 2007). Durante o período pré-implantatário, o útero sofre alterações importantes que são estimuladas por estrogénios e, maioritariamente, pela progesterona que é essencial para o sucesso da implantação e manutenção da gravidez. Desta forma, patologias associadas à secreção inadequada de progesterona pelo corpo lúteo poderão comprometer a gravidez, sendo alguns exemplos a Deficiência na fase Lútea, Hiperprolactinemia e Síndrome do ovário policístico. Outras patologias endócrinas como doenças da tiróide, hipoparatiroidismo e diabetes não

INTRODUÇÃO

controlada têm sido também considerados factores etiológicos na perda recorrente da gravidez (Anselmo et al., 2004; Luisi et al., 2007).

1.2.2.3 Causas imunológicas

Segundo uma perspectiva imunológica, a sobrevivência semi-alogénica de um feto depende da supressão da resposta do sistema imunológico materno. No entanto, apesar da alteração das funções linfocitárias durante a gravidez, a supressão generalizada da resposta imune materna não se verifica (Rai and Regan, 2006). O entendimento da imunologia reprodutiva reflecte uma interacção cooperativa entre o sistema imunológico materno e os antígenos fetais.

As células *Natural Killer* (NK) são células linfocitárias que conforme a sua localização, sangue periférico ou mucosa uterina, poderão ser funcional e fenotipicamente diferentes (Koopman et al., 2003). A distribuição espacial e temporal das células NK na mucosa uterina sugere que estas terão um contributo importante no controlo da invasão trofoblástica. Segundo a literatura, as mulheres com abortamentos recorrentes terão maior quantidade de células NK na sua mucosa uterina que os controlos, verificando-se ainda que níveis mais elevados de células NK na mucosa uterina são encontradas em mulheres com as maiores taxas de abortamentos em gravidezes sucessivas e sem tratamento (Lachapelle et al., 1996; Quenby et al., 1999). Não foi, no entanto, encontrada relação entre os níveis de células NK no sangue periférico e os níveis existentes na mucosa uterina, o que implica que os níveis de células NK do sangue periférico não serão preditivos numa futura gravidez de um casal com abortamento recorrentes.

O Síndrome Antifosfolipídico constitui a causa tratável mais importante do abortamento recorrente. Este síndrome consiste numa série de manifestações que envolvem trombooses arteriais e/ou venosas, acompanhadas de trombocitopenia ligeira a moderada e com presença elevada de anticorpos antifosfolipídicos: anticoagulantes Lúpicos e anticardiolipinas (Twig et al., 2007). A prevalência deste síndrome em mulheres com abortamentos recorrentes é de cerca de 15%, sendo que na presença deste Síndrome as mulheres têm um

risco de aproximadamente 90% de novo abortamento se a causa não for tratada (Empson et al., 2002; Rai et al., 1995). Os critérios para o diagnóstico de um Síndrome Antifosfolípídico incluem três ou mais abortamentos consecutivos sem causa conhecida antes das 10 semanas, uma ou mais mortes inexplicadas de um feto morfológicamente normal acima das 10 semanas de gravidez e uma ou mais mortes prematuras de um feto morfológicamente normal até às 34 semanas e associado a pré-eclampsia grave ou insuficiência placentária (Rai and Regan, 2006).

Mulheres portadoras de Lúpus Eritematoso Disseminado têm um risco elevado de abortamento espontâneo e recorrente em todos os trimestres da gravidez. A prevalência do Síndrome Antifosfolípídico nestas mulheres é de 37%, sendo que a associação das duas condições é um indicador de mau prognóstico reprodutivo.

1.2.2.4 Causas trombofílicas

Algumas das causas trombofílicas poderiam ser formalmente consideradas causas genéticas. No entanto e uma vez que ficam um pouco fora do âmbito desta tese foram descritas neste grupo.

A etiologia da perda de gravidez permanece ainda, muitas vezes por explicar, mesmo após a exclusão de anomalias uterinas, genéticas, imunológicas, infecciosas ou endócrinas. Mais recentemente, a presença de factores trombofílicos herdados ou adquiridos tem sido descrita num número crescente de mulheres com abortamentos recorrentes de causa desconhecida (Kovalevsky et al., 2004; Krabbendam et al., 2005; Rey et al., 2003).

A maioria das mutações génicas associadas às trombofilias tem habitualmente transmissão autossómica dominante e produzem estados de hipercoagulabilidade, especificamente o Factor V de *Leiden* (FVL) (G1691A), factor II ou gene da protrombina (G20210A) e ainda polimorfismos do metilenotetraidrofolato reductase (C677T). Em adição, deficiências na proteína S, proteína C e antitrombina e hiperhomocisteinemia podem também induzir estados de hipercoagulabilidade (Stephenson and Kutteh, 2007).

INTRODUÇÃO

A mutação do gene que codifica para o FVL é das causas trombofílicas herdadas, a mais frequentemente estudada associada a complicações na gravidez ou abortamento recorrente. Num estudo prospectivo realizado num grupo de mulheres com abortamentos recorrentes e sem tratamento, verificou-se uma taxa de gravidez significativamente mais baixa (37,5%) nas mulheres com mutações do FVL em comparação com mulheres genotipicamente normais para o FVL (69,5%) (Rai et al., 2002). Uma meta-análise realizada posteriormente com o objectivo de confirmar uma associação entre a presença deste tipo de mutações e complicações na gravidez indicou uma associação clara entre abortamentos recorrentes do segundo e terceiro trimestre de gravidez, pré-eclampsia e restrição de crescimento fetal. Para o primeiro trimestre de gravidez foram obtidos, no entanto, resultados inconsistentes (Carrington et al., 2005; Dudding and Attia, 2004).

O mecanismo patofisiológico exacto subjacente à perda de gravidez de mulheres com trombofilias herdadas não é totalmente conhecido, tendo sido sugerido que estes factores trombofílicos poderiam exercer um efeito negativo no crescimento e função trofoblástica (Dudding and Attia, 2004; Sikkema et al., 2002). Não foram, no entanto, encontradas evidências histológicas claras que apoiassem esta teoria (Morssink et al., 2004).

1.2.2.5 Causas infecciosas

Segundo a literatura, 10 a 25% das perdas de gravidez do segundo trimestre serão de causa infecciosa (Goldenberg and Thompson, 2003). Esta associação entre infecção e abortamento espontâneo já não é tão evidente durante o primeiro trimestre de gravidez (Hay, 2004).

A associação entre a presença de vaginoses bacterianas e de abortamento precoce durante o primeiro trimestre de gravidez revelou-se, na maioria dos estudos efectuados, bastante inconsistente (Rai and Regan, 2006; Ralph et al., 1999). No entanto, segundo a literatura, o tratamento precoce de vaginoses bacterianas, ocorridas durante o primeiro trimestre de gravidez, reduz o risco de parto pré-termo em mulheres com historial de partos pré-termo (Hay et al., 1994) .

A maioria dos estudos refere vários agentes infecciosos, incluindo bactérias, protozoários, vírus e fungos, mas apenas para alguns foi demonstrado uma associação clara entre a presença da infecção e a perda de gravidez. Exemplos disso são a Sífilis, o parvovírus B19, o vírus da imunodeficiência humana (HIV), malária e listeriose (Aljicevic et al., 2005; Garcia-Enguidanos et al., 2002; Weselak et al., 2008).

1.2.2.6 Causas exógenas

Aproximadamente 60% dos abortamentos espontâneos terão como causa factores genéticos, infecciosos, hormonais e/ou imunológicos. Adicionalmente, a presença de factores ambientais adversos e/ou de agentes exógenos nocivos poderão ser também uma causa significativa da perda de gravidez. Todavia, o papel específico dos vários factores ambientais (químicos e físicos) na etiologia do abortamento espontâneo permanece ainda por clarificar (Weselak et al., 2008).

Dentro dos factores de risco exógenos considerados, actualmente, de maior importância, poderão incluir-se agentes tóxicos que interfiram com a produção de estrogénios e progesterona como certos bifenilos policlorinados (PCB), bisfenol A, pesticidas (ex: DDT), certos químicos do fumo do cigarro, dioxinas e teratogénios como certos medicamentos, metais pesados e radiação (Garry et al., 2002; Milton et al., 2005; Revich et al., 2001; Weselak et al., 2008).

Outras causas possíveis incluem os chamados factores associados ao estilo de vida como o consumo abusivo de tabaco, cafeína, álcool e de drogas ilícitas. Porém, a maioria dos estudos é inconsistente, verificando-se algum enviesamento e dificuldade em analisar cada factor isoladamente, pelo menos para a maioria dos estudos epidemiológicos realizados (Henriksen et al., 2004; Nielsen et al., 2006; Signorello and McLaughlin, 2004; Weselak et al., 2008).

A presença de agentes físicos como as radiações ionizantes, campos electromagnéticos, excesso de ruído, trabalhos excessivamente pesados e hipertermia são ainda outros factores que poderão ser associados a um

INTRODUÇÃO

aumento do risco de perda de gravidez (Auvinen et al., 2001; Li et al., 2003; Li et al., 2002; Meyer et al., 1989; Weselak et al., 2008).

1.3 Métodos de estudo da patologia cromossómica

Apesar do domínio da era genómica, a análise tradicional dos cromossomas ou seja o cariótipo, permanece ainda como um dos principais instrumentos de diagnóstico na caracterização de patologias cromossómicas.

O estudo citogenético tradicional de abortamentos espontâneos implica a realização de uma cultura celular de vilosidades coriônicas, tecido fetal ou placenta seguida da análise cromossómica por bandas G, isto é, implica a obtenção de tecidos viáveis, estabelecimento, manutenção de culturas primárias e obtenção de cromossomas metafásicos. O cariótipo permite detectar aneuploidias, triploidias, cromossomas derivativos, rearranjos equilibrados ou desequilibrados com uma resolução superior a 5MB. Esta técnica tem algumas limitações, como a falência de culturas (10-40%) (Lomax et al., 2000), contaminação externa e crescimento selectivo de células maternas (Bell et al., 1999). Assim, em apenas cerca de 60% dos casos de abortamentos espontâneos é possível obter um cariótipo usando a técnica convencional de cultura celular. Esta limitação torna não informativos muitos dos estudos efectuados, não permitindo um aconselhamento genético adequado aos casais com abortamentos de repetição. A Hibridação Genómica Comparativa (CGH) é uma técnica do âmbito da citogenética molecular e que permite detectar ganhos ou perdas de segmentos cromossómicos recorrendo à Hibridação *in situ* de Fluorescência (Kallioniemi et al., 1992). Esta técnica permite o rastreio completo do genoma para anomalias desequilibradas e depende apenas da extracção de DNA da amostra a ser analisada, em vez da realização de cultura celular e realização de preparações cromossómicas em metafase. Neste método, são marcados a cores distintas dois tipos de DNA genómico, teste (material a ser estudado) e referência (controlo), sendo posteriormente hibridados num espalhamento de metafases humanas normais mediante a presença de DNA repetitivo não marcado (cot-1 DNA). A hibridação diferencial de fluorescência que se obtém representa os ganhos ou perdas do DNA teste relativamente ao

INTRODUÇÃO

DNA de referência. A razão entre o DNA teste e o de referência é quantificada e analisada usando um sistema de análise digital (Bryndorf et al., 1995; du Manoir et al., 1995). A técnica de CGH, não invalidando o estudo citogenético convencional (muito útil em caso de sucesso de cultura), surge como uma mais valia, permitindo o estudo sistemático de todos os produtos de abortamento com indicação para estudo citogenético, sendo apenas necessário cerca de 1µg de DNA do caso a estudar e permitindo ainda o estudo retrospectivo de produtos de abortamento parafinados ou de tecidos congelados.

Actualmente, a técnica de CGH tradicional tem sido substituída pela técnica de *Arrays* CGH, também denominada de Cariótipo Molecular. Esta técnica baseia-se no mesmo princípio da técnica de CGH tradicional mas os cromossomas em metafase são substituídos por um número muito elevado de sequências de DNA que são colocados por um sistema robótico em lâminas de vidro. Estas sequências podem ser YACs, BACs, PACs ou oligonucleotídeos. Tal como a técnica tradicional, não detecta alterações de ploidia nem rearranjos equilibrados mas tem maior resolução (1MB ou mesmo menos) (Benkhalifa et al., 2005; Schaeffer et al., 2004).

A técnica de Hibridação *in situ* de Fluorescência (FISH) permite a identificação de aneuploidias em células em interfase e a detecção de alterações de ploidia (que não são detectadas pela CGH). Pode ainda ser utilizada para confirmar resultados obtidos pela técnica de CGH e permite ainda detectar situações de mosaicismo, mesmo de baixo grau (<10%) ou de contaminação materna, tendo por isso grande aplicabilidade no estudo de produtos de abortamento.

Adicionalmente, existem ainda outras técnicas do âmbito da biologia molecular bastante eficientes, tecnicamente fáceis de executar e de baixo custo, como as técnicas de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) e *Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction* (QF-PCR). Resumidamente, o MLPA permite a quantificação relativa de sequências de DNA diferentes, numa só reacção e com uma quantidade mínima de DNA da amostra. Para cada sequência genómica existem duas sondas que hibridam em posições adjacentes da sequência alvo. Cada sonda consiste numa sequência de 22 a 43 nucleotídeos específica e numa sequência universal de ligação do primer *forward* ou *reverse*. Adicionalmente, cada sonda possui ainda uma sequência de

INTRODUÇÃO

tamanho variável, de 19 a 364 nucleotídeos. Após hibridação durante a noite com o DNA alvo, cada par de sondas adjacentes é unido pela acção de uma ligase, sendo depois efectuado a PCR com um único par de *primers* marcados com um fluorocromo. Actualmente, existem vários kits que permitem estudar diferentes regiões do genoma. O kit de MLPA (SALSA P095-A2, MRC-Holland) permite a detecção das aneuploidias mais comuns, 13, 18, 21, X e Y, e pode ser aplicada ao estudo de produtos de abortamento.

O QF-PCR permite também a análise das aneuploidias dos cromossomas 13, 18, 21, X e Y mas permite ainda a detecção de triploidias e de contaminação materna. A técnica combina uma PCR convencional com uma técnica de fluorescência quantitativa e baseia-se na amplificação de sequências específicas repetitivas de DNA, designadas de *short tandem repeats* (STRs) para os cromossomas anteriormente referidos (Andonova et al., 2004; Cirigliano et al., 2001; Donaghue et al., 2003; Mansfield, 1993). Os STRs são polimórficos e estáveis, variando no comprimento consoante o número de repetições (Cirigliano et al., 2006). Os marcadores polimórficos são amplificados por PCR usando primers fluorescentes que permitem a visualização e quantificação dos produtos através do cálculo das áreas dos picos relativos a cada uma das amplificações registadas no sequenciador automático (Lee et al., 2004).

2. Epigenética no contexto da perda de gravidez

2.1 Definição e conceitos gerais

A palavra “epigenética” significa literalmente “sobre a sequência génica”. O termo foi inicialmente introduzido por Conrad Waddington no início dos anos quarenta que o definiu por “ramo da biologia que estuda as interacções entre os genes e os seus produtos e que pode alterar o fenótipo”. O termo evoluiu no sentido de incluir qualquer processo que altere a actividade génica sem alteração da sequência de DNA, levando a modificações que podem ser transmitidas a células filhas (Weinhold, 2006). Vários mecanismos têm sido

identificados como processos epigenéticos, sendo os mais estudados a metilação do DNA, o *imprinting* genómico e a remodelação da cromatina.

A investigação na área da epigenética tem tido um crescimento muito rápido devido aos avanços tecnológicos na área da biologia molecular, biotecnologia e genómica. Nesta época, já considerada pós-genómica, o reconhecimento da interacção entre genes e o ambiente tem interessado muito os investigadores. Durante o desenvolvimento intra-uterino esta interface genes/ambiente assume um papel extremamente relevante, onde qualquer alteração poderá influenciar o desenvolvimento fetal, assim como comprometer uma vida saudável ao longo de toda uma vida adulta. Este fenómeno também conhecido como “programação fetal” é um modelo de interacção genes/ambiente e pode permitir um conhecimento sobre os mecanismos básicos dos efeitos sinérgicos entre o ambiente e as características moleculares que interferem no desenvolvimento (Maccani and Marsit, 2009). De qualquer forma, e tendo em conta todo o conhecimento e diversidade sobre o tema da epigenética, a investigação tem-se centrado em quatro modelos principais de regulação epigenética: metilação do DNA, *imprinting* genómico, remodelação da cromatina e no controlo mediado por *small* RNAs especificamente miRNAs. Uma vez que o tema da tese aborda principalmente o modelo do *imprinting* genómico, a revisão dos conhecimentos será feita essencialmente para este modelo, efectuando-se uma revisão muito sucinta sobre os outros três processos.

2.2 Metilação do DNA

A metilação do DNA corresponde a um dos modelos epigenéticos mais bem estudados. É realizada por um grupo de enzimas, as metiltransferases do DNA (DNA *methyltransferases* - DNMTs) que são responsáveis pela adição de grupos metil a resíduos de citosina, que se encontrem sob a forma de dinucleotídios CG, denominadas de CpGs (Nafee et al., 2008). Ao longo do genoma existem sequências específicas com um conteúdo muito rico em citosinas/guaninas e aproximadamente 1kb de comprimento, que se localizam habitualmente nas regiões promotoras dos genes, em cerca de 60-70% de todo

INTRODUÇÃO

o genoma humano. Estas regiões denominam-se de “ilhas CpG (*cytosine-phosphate-guanine*)” (Bird et al., 1985; Illingworth and Bird, 2009; Larsen et al., 1992). Habitualmente, quando uma série de citosinas de uma “ilha ou ilhas CpG” (CGIs), localizadas numa região promotora de um gene, é metilada, esse gene ficará em princípio silenciado e essa região denomina-se hipermetilada. Pelo contrário, na ausência de metilação da região promotora do gene contendo a CGI, o gene em questão deverá estar, à partida, activo ou não silenciado, denominando-se a região de hipometilada. Esta regra aplica-se na maioria das vezes, mas existem algumas excepções (Maccani and Marsit, 2009).

O estado de metilação de uma CGI é mantido após replicação do DNA pelas metiltransferases do DNA (Bestor et al., 1988) e dessa forma herdado ao longo das gerações. No genoma dos mamíferos, a maioria das CpG encontra-se metilada em percentagens que variam entre 60 a 90% segundo a literatura (Ohgane et al., 2008). No entanto, nas CGIs propriamente ditas as CpGs têm níveis baixos de metilação (Illingworth and Bird, 2009; Nafee et al., 2008)

2.3 Remodelação da cromatina

Nas células eucariotas, o DNA encontra-se sob a forma de um complexo núcleo-proteico denominado de cromatina, na qual o DNA se encontra enrolado a um octâmero de proteínas histónicas (H2A, H2B, H3 e H4) formando o nucleossoma, unidade fundamental da cromatina. A modulação da estrutura da cromatina é essencial para a regulação da expressão génica, uma vez que determina a acessibilidade ao DNA localizado internamente e ao recrutamento de factores de regulação. A estrutura da cromatina é dinâmica e pode ser significativamente modificada por exemplo no seu grau de compactação por reacções químicas em vários aminoácidos constituintes das histonas. Estas modificações incluem metilação, acetilação, fosforilação, ubiquinação e ADP-ribosilação (Kimura et al., 2004; Klose and Bird, 2006; Nafee et al., 2008). O efeito combinado destas modificações tem um papel decisivo no controlo da actividade génica. Segundo a literatura, enzimas metiltransferases, envolvidas na transferência de grupos metil para as histonas, assim como determinados co-activadores da transcrição com actividade de acetiltransferase e desacetilase,

terão um papel importante na modificação das histonas (Li, 2002; Strahl and Allis, 2000; Zhang and Reinberg, 2001).

Estudos recentes indicam que a modificação das histonas segue uma ordem sequencial, que poderá ser específica de cada gene (Agalioti et al., 2000). Por outro lado, a existência de modificações nas histonas específicas de cada local poderá sugerir uma espécie de código histónico que afecte não só a estrutura da cromatina como também de vários complexos transcripcionais levando a activação ou ao silenciamento de genes (Berger, 2002; Maccani and Marsit, 2009; Rice and Allis, 2001).

2.4 *small*RNAs e *mi*RNAs

Uma vez que estas pequenas moléculas de RNA regulatórias (*small*RNAs) são capazes de alterar a expressão génica e proteica sem alterarem a sequência génica, são consideradas mecanismos importantes da regulação epigenética.

Os *mi*RNAs pertencem a uma classe de *small*RNAs que são formados por transcriptos que mostraram a capacidade de enrolamento sobre si gerando estruturas características em forma de gancho. São transcritos pela RNA polimerase II como parte de uns transcriptos denominados de *mi*RNAs primários (*pri-mi*RNAs) e que incluem caudas terminais 5'-*caps* e 3'-*poli*(A) (Maccani and Marsit, 2009).

Segundo a literatura, a expressão génica regulada por *mi*RNAs terá por base a ligação específica a um transcripto de RNAm. O mecanismo exacto desta regulação pós-transcricional varia, dependendo de uma série de factores, sendo provavelmente o grau de complementaridade do *mi*RNA com a sequência mRNA alvo uns dos mais importantes (Lagos-Quintana et al., 2001). Tem sido atribuído um papel importante aos *mi*RNA numa série de respostas ao stress oxidativo, na prevenção e no desenvolvimento ou progressão do cancro (Mocellin et al., 2009; van Rooij et al., 2007).

O papel dos *mi*RNA na placenta é actualmente um assunto de grande interesse e devido ao papel crucial que se sabe que estes têm em processos que interferem com o desenvolvimento humano, será de esperar que novas

INTRODUÇÃO

descobertas possam contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos epigenéticos na placenta.

2.5 *Imprinting* genómico

O *imprinting* genómico é um mecanismo epigenético que resulta numa expressão monoalélica, ou seja, existe expressão diferencial de um gene ou de uma região cromossómica de acordo com a origem parental. Difere do tipo de mecanismo genético clássico, uma vez que o complemento parental não é equivalente em termos da expressão de genes *imprinted*, apesar de ambos os progenitores contribuírem de uma forma equitativa com o seu conteúdo genético para a sua descendência. Alguns genes são expressos apenas pelo cromossoma materno herdado (*imprinting* paterno) e outros são expressos pelo paterno (*imprinting* materno).

O *imprinting* genómico foi descrito pela primeira vez em 1984, quando se percebeu que zigotos de ratinhos com dois pró-núcleos masculinos ou com dois pró-núcleos femininos não se podiam desenvolver até termo, o que sugeria que os genomas parentais não eram funcionalmente equivalentes e que ambos seriam necessários para uma embriogénese normal (McGrath and Solter, 1984; Surani et al., 1984). Na espécie humana foram observadas condições semelhantes que produzem uma concepção anormal, como no caso da presença de dois complementos cromossómicos masculinos e nenhum feminino (46 cromossomas) que originar a formação de uma mola hidatiforme completa ou a presença de dois complementos cromossómicos masculinos e um feminino (69 cromossomas) que pode dar origem a uma mola hidatiforme parcial.

Vários grupos dedicaram-se ao estudo do *imprinting* genómico em diferentes espécies de mamíferos concluindo que este fenómeno se encontra bastante conservado entre os mamíferos placentários especialmente os primatas, roedores e ruminantes. Para espécies marsupiais foram também identificados alguns genes *imprinted* como o *IGF2* (*insulin-like growth factor 2*) ou o *IGF2R* (*insulin-like growth factor 2 receptor*) (Suzuki et al., 2005). Para outras espécies de vertebrados não mamíferos como a galinha e o peixe não foram encontradas evidências de existência de *imprinting* genómico (Yokomine

et al., 2005). Estas observações sugerem que o *imprinting* genómico poderá ter surgido durante a evolução dos mamíferos e que deverá estar relacionada com a função e o desenvolvimento da placenta (Ferguson-Smith and Surani, 2001; Reik and Lewis, 2005; Wagschal and Feil, 2006).

2.5.1 *Imprinting* genómico no embrião

A embriogénese compreende uma série de eventos muito bem orquestrados que se inicia com a fertilização e subsequentemente a formação de um zigoto (com uma só célula) e que termina na formação de um organismo multicelular, integrando mais de 200 tipos de células diferentes. A maioria das células de um embrião diferencia-se em tipos de células histológica e funcionalmente distintas e uma vez diferenciadas, o estado celular é mantido estável e transmitido à geração seguinte. O padrão de expressão génica no processo de diferenciação celular e na formação de células especializadas é controlado por dois mecanismos: o primeiro é o imposto pela sequência génica propriamente dita (código genético), o segundo relaciona-se com modificações epigenéticas que podem alterar a regulação da expressão génica (Reik et al., 2001; Surani, 2001).

Cada tipo de célula diferenciada possui a sua assinatura epigenética, que reflecte o genótipo, o seu desenvolvimento e as influências ambientais sofridas, o que em última análise se reflecte no fenótipo da célula e do organismo (Nafee et al., 2008). Para a maioria das células de um indivíduo estas marcas epigenéticas são estabelecidas aquando da diferenciação celular ou no fim de um ciclo celular. No entanto, durante o desenvolvimento normal e por vezes em situações patológicas, algumas células sofrem alterações epigenéticas (reprogramação). Isto envolve a remoção das marcas epigenéticas no núcleo seguida da implementação de outras marcas epigenéticas distintas (Morgan et al., 2005; Reik et al., 2001). Devido à complexidade destes mecanismos epigenéticos é necessário uma coordenação extremamente eficaz para que mecanismos de regulação actuem assegurando uma correcta implementação e manutenção destas marcas epigenéticas. A falha destes mecanismos de regulação pode levar a alterações da expressão de genes que

INTRODUÇÃO

resultam em anomalias do desenvolvimento ou cancro (Arnaud and Feil, 2005; Feinberg and Tycko, 2004).

As alterações epigenéticas são produzidas por modificações reversíveis no DNA e na estrutura da cromatina. O *imprinting* genómico é uma modificação epigenética na qual a expressão específica de cada alelo depende da transmissão pela linha germinativa de acordo com o sexo. O apagamento, estabelecimento e manutenção das marcas de *imprinting* é um processo dinâmico que tem de ser correctamente reprogramado em cada ciclo reprodutivo. Estudos em ratinho demonstraram que o apagamento das marcas de *imprinting* ocorre nas células da linha germinativa e que o restabelecimento dessas marcas ocorre durante a gametogénese, ainda com o genoma materno e paterno fisicamente separados, sendo a altura da aquisição do imprinting genómico significativamente diferente entre as duas linhas germinativas feminina e masculina (Lucifero et al., 2004). Na figura 6 é possível observar um esquema do ciclo de vida das marcas de *imprinting* genómico num modelo de ratinho. Na linha germinativa masculina a aquisição de metilação ocorre numa fase pré-natal do desenvolvimento do espermatozóide e na linha germinativa feminina numa fase pós-natal de maturação do ovócito (Weaver et al., 2009).

Após as alterações epigenéticas ocorridas durante a gametogénese, a fertilização provoca uma nova série de modificações epigenéticas, nas quais as marcas de *imprinting* estabelecidas nos gâmetas terão de ser mantidas (Figura 6). Nesta altura, dois genomas altamente especializados têm de ser combinados numa única célula, integrados e reprogramados para formar uma célula pluripotente e permitir o desenvolvimento embrionário. Desta forma, logo após a fecundação, o genoma materno é desmetilado ao fim de alguns ciclos celulares, consistindo num mecanismo passivo no qual a metilação do DNA não sofre replicação durante a fase S. O pro-núcleo paterno, ao contrário, perde essencialmente toda a metilação logo após a primeira divisão do zigoto, sugerindo tratar-se de um processo enzimático activo (Santos et al., 2002).

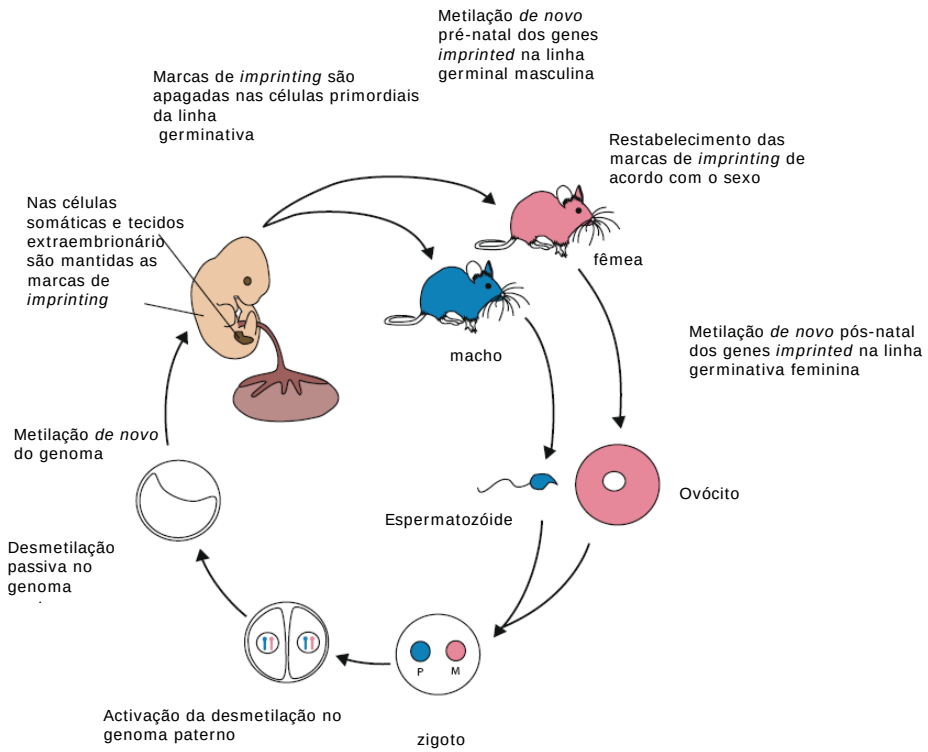


Figura 6. Implementação, manutenção e apagamento das marcas de *imprinting*, durante um ciclo de vida nos mamíferos (Adaptado de Weaver *et al.*, 2009).

Apesar destas alterações globais, os genes *imprinted* têm de manter o padrão de metilação que lhes foi estabelecido na linha germinativa de forma a poderem expressar esse padrão correctamente, mais tarde durante o desenvolvimento (Tremblay *et al.*, 1995). Segundo a literatura mais recente, o envolvimento das enzimas metiltransferases do DNA (Dnmt) nomeadamente das isoformas Dnmt1 e Dnmt10 na manutenção das marcas de *imprinting* do embrião parece causar consenso, no entanto, novas proteínas e mecanismos poderão num futuro muito próximo ser descobertos (Cirio *et al.*, 2008; Hirasawa *et al.*, 2008).

Um conhecimento mais pormenorizado de todo o processo vai permitir um melhor entendimento nos mecanismos epigenéticos que comandam o *imprinting* genómico.

INTRODUÇÃO

2.5.2 *Imprinting* genómico na placenta

Nos mamíferos, o desenvolvimento e sobrevivência de um embrião que se traduza numa gravidez bem sucedida é dependente da criação de uma interface funcional materno-fetal. A placentação compreende uma série de passos que se iniciam logo no primeiro contacto materno-fetal após a formação do embrião, seguida da implantação (que se caracteriza por invasão das células trofoblásticas no endométrio materno), culminando com a formação de uma placenta corioalantóide.

A placenta é o primeiro órgão a ser formado durante uma gravidez. É responsável pelo estabelecimento de conexões vasculares entre a mãe e o feto, permitindo que ocorram trocas gasosas, de nutrientes e excretoras. Este órgão está também envolvido na protecção imunológica do feto e na produção de hormonas necessárias para o crescimento fetal.

A criação de um ambiente materno adequado para o desenvolvimento fetal depende de um funcionamento e desenvolvimento apropriado das células do trofoblasto, que por sua vez requerem uma boa coordenação da expressão de muitos factores de transcrição, reguladores do ciclo celular, factores de crescimento, citocinas e receptores de superfície (Bressan et al., 2009; Hemberger and Cross, 2001; Watson and Cross, 2005). A embriogénese e a placentação são particularmente sensíveis a alteração da expressão de genes, uma vez que todos estes processos dependem de uma cascata complexa de acontecimentos. Qualquer interrupção dessa tão bem orquestrada regulação pode levar a patologias placentárias, alterando o fenótipo ou mesmo à morte prematura espontânea do feto.

A maioria dos estudos refere que a regulação do *imprinting* nos tecidos extra-embrionários, nomeadamente na placenta, não é feita da mesma forma que no embrião. Particularmente, a manutenção do padrão de *imprinting* parece ser menos dependente da metilação do DNA e mais dependente de processos de remodelação da cromatina (Lewis et al., 2004; Pliushch et al., 2010; Wagschal and Feil, 2006).

A importância fisiológica do *imprinting* genómico na espécie humana pode ser demonstrada pela presença de doenças resultantes de mutações ou epimutações em genes *imprinted*. Estas patologias humanas, designadas de

INTRODUÇÃO

Síndromes do *imprinting*, são raras mas compreendem um grupo bastante diverso de patologias que envolvem primariamente alterações do crescimento e do desenvolvimento neurológico. Consistentemente, a maioria destes genes são expressos na placenta humana (Coan et al., 2005; Diplas et al., 2009). Estas patologias do *imprinting* podem resultar de alterações da expressão dos genes *imprinted* que podem ser devidas, em parte, ou totalmente a um funcionamento anormal da placenta. Tendo em conta que a placenta é um órgão essencial ao crescimento fetal, foram já descritos vários genes *imprinted* expressos na placenta e implicados em patologias que envolvem alterações do crescimento fetal (Tabela 5) (Frost and Moore, 2010).

Tabela 5. Genes *imprinted* expressos na placenta humana, cujas perdas ou ganhos de expressão foram já descritos como associados a fenótipos relacionados com alterações do crescimento.

Locus	Gene	Alelo Expresso	Fenótipo se bialélico ou sobre-expresso	Fenótipo se deleção/perda de expressão/mutação
6q24-q25	<i>PLAGL1</i>	P	Diabetes Mellitus neonatal	Expressão reduzida na RCF
	<i>GRB10</i>	P(c)/M(t)	SRS (pDUP7)	Roedores KO exibem desproporção fetal e crescimento placentário aumentado
7q21	<i>PEG10</i>	P	Carcinoma Hepatocelular, associada a RCF	Não há formação do espongiotrofoblasto em Roedores KO
7q32	<i>MEST iso1</i>	P		SRS (mDUP7); Roedores KO exibem restrição de crescimento pré e pósnatal
	<i>MEST iso2</i>	P		
	<i>MEST1T 1</i>	P		
11p15	<i>H19</i>	M	SRS	BWS
	<i>IGF2</i>	P	BWS; Tumor de Wilms e outros	SRS
	<i>KCNQ1</i>	M		BWS + Síndrome QT longo 1
	<i>KCNQ1OT1</i>	P	BWS; Tumor de Wilms e outros	
	<i>CDKN1C</i>	M		BWS + Defeitos da parede abdominal
	<i>SLC22A18</i>	M		Desconhecido mas incluído na região BWS
	<i>SLC22A18AS</i>			Desconhecido mas incluído na região BWS
	<i>PHLDA2</i>	M	Peso baixo ao nascimento, RCIU; Roedores exibem sobre crescimento do labirito e do espongiotrofoblasto	Aumento do peso à nascença, incluído na região BWS; Roedores KO apresentam hiperplasia placentária, especificamente do espongiotrofoblasto
14q32	<i>DLK1</i>	P	BWS; Roedores com aumento de peso ao nascimento mas com compromisso do desenvolvimento	Roedores KO exibem RCF, de com aumento de peso ao nascimento mas com compromisso do desenvolvimento
19q13	<i>ZNF331</i>	M		Expressão reduzida na RCF
20q13	<i>GNAS XL</i>	P		Osteodistrofia Albright's hereditária
	<i>GNAS exão 1A</i>	P		Roedores KO exibem RCF, de com aumento de peso ao nascimento mas com compromisso do desenvolvimento

Para alguns genes foi também referido o fenótipo observado em modelos de roedores Muridae knock-out (KO); P - paterno; M - materno; c - cérebro; t - trofoblasto; RCF - restrição de crescimento fetal; pDUP - dissomia uniparental paterna; mDUP - dissomia uniparental materna; SRS - Síndrome de Silver-Russel; BWS - Síndrome de Beckwith-Wiedemann.

INTRODUÇÃO

2.6 Genes *Imprinted*

Aproximadamente 200 genes estão descritos como *imprinted* no genoma dos mamíferos (Luedi et al., 2007), tendo já sido publicados pelo menos 63 para a espécie humana e mais de 90 para o rato (<http://www.geneimprint.com> ou <http://igc.otago.ac.nz>). Na tabela 6 apresentam-se os genes humanos *imprinted* que estão presentemente descritos na literatura.

Estes genes tendem a agrupar-se formando domínios cromossómicos de genes *imprinted* (*clusters*). Estes domínios foram encontrados em vários cromossomas, sendo de referir as regiões cromossómicas 7q32, 11p15, 15q11 e 20q13. Estes *clusters* de genes são regulados via um Centro de *Imprinting* (IC – *Imprinting Center*), que são regiões do DNA que regulam a expressão de genes *imprinted*, por vezes à distância de uma megabase, e que podem estar associados a transcritos de RNA não codificantes e a regiões diferencialmente metiladas (DMR – *Differentially Methylated Regions*) (Smith et al., 2007).

Tabela 6. Genes humanos *imprinted*

Gene	Aliases	Localização	Alelo Expresso
<i>TP73</i>	P73	1p36.3	Materno
<i>DIRA53</i>	ARHI, NOEY2	1p31	Paterno
<i>NAP1L5</i>	DRLM	4q22.1	Paterno
<i>PLAGL1</i>	ZAC, LOT1, ZAC1, MGC126275, MGC126276, DKFzp781P1017	6q24-q25	Paterno
<i>HYMAI</i>	NCRNA00020	6q24.2	Paterno
<i>SLC22A2</i>	OCT2, MGC32628	6q26	Materno
<i>SLC22A3</i>	EMT, EMTH, OCT3	6q26-q27	Materno
<i>COPG2/IT1</i>	CIT1, COPG2AS, FLJ14646, NCRNA00170, DKFZP761N09121	7q32	Paterno
<i>DDC</i>	AADC	7p12.2	Dependente da Isoforma
<i>GRB10</i>	RSS, IRBP, MEG1, GRB-IR, Grb-10, KIAA0207	7p12-p11.2	Dependente da Isoforma
<i>TFPI2</i>	PP5, REF1, TFPI-2, FLJ21164	7q22	Materno
<i>SGCE</i>	ESG, DYT11	7q21-q22	Paterno
<i>PEG10</i>	Edr, HB-1, Mar2, MEF3L, Mart2, RGAG3, KIAA1051	7q21	Paterno
<i>PPP1R9A</i>	NRB1, NRBI, FLJ20068, KIAA1222, Neurabin-I	7q21.3	Materno
<i>DLX5</i>		7q22	Materno
<i>CPA4</i>	CPA3	7q32	Materno
<i>MEST</i>	PEG1, MGC8703, MGC111102, DKFZp686L18234	7q32	Paterno
<i>MESTIT1</i>	PEG1-AS, NCRNA00040	7q32	Paterno
<i>KLF14</i>	BTEB5	7q32.3	Materno
<i>DLGAP2</i>	DAP2, SAPAP2	8p23	Paterno
<i>KCNK9</i>	KT3.2, TASK3, K2p9.1, TASK-3, MGC138268, MGC138270	8q24.3	Materno
<i>ABCA1</i>	TGD, ABC1, CERP, ABC-1, HDLDT1, FLJ14958, MGC164864, MGC165011	9q31.1	
<i>INPP5F V2</i>	SAC2, hSAC2, MSTP007, MSTPO47, FLJ13081, KIAA0966, MGC59773, MGC131851	10q26.11	Paterno
<i>KCNQ10T1</i>	LIT1, KvDMR1, KCNQ10T1, KvLQT1-AS, long QT intronic transcript 1	11p15	Paterno
<i>H19</i>	ASM, BWS, ASM1, MGC4485, PRO2605, D11S813E	11p15.5	Materno
<i>IGF2</i>	INSIGF, pp9974, C11orf43, FLJ22066, FLJ44734	11p15.5	Paterno
<i>IGF2AS</i>	PEG8, MGC168198	11p15.5	Paterno
<i>INS</i>	ILPR, IRDN	11p15.5	Paterno
<i>KCNQ1</i>	LQT, RWS, WRS, LQT1, SQT2, ATFB1, ATFB3, JLNS1, KCNA8, KCNA9, Kv1.9, Kv7.1, KVLQT1, FLJ26167	11p15.5	Materno
<i>KCNQ1DN</i>	BWRT, HSA04617	11p15.4	Materno
<i>CDKN1C</i>	BWS, WBS, p57, BWCR, KIP2	11p15.5	Materno
<i>SLC22A18</i>	HET, ITM, BWR1A, IMPT1, TSSC5, ORCTL2, BWSR1A, SLC22A11, p45-BWR1A, DKFZp667A184	11p15.5	Materno
<i>PHLDA2</i>	IPL, BRW1C, BWR1C, HIDA2, TSSC3	11p15.5	Materno
<i>OSBP15</i>	ORP5, OBPH1, FLJ42929	11p15.4	Materno
<i>WT1-Alt trans</i>	WT1, GUD, WAGR, WT33, WIT-2	11p13	Paterno
<i>RBP5</i>	CRBP3, CRBPIII, CRBP-III	12p13.31	Materno
<i>MEG3</i>	GTL2, FP504, preb1, PRO0518, PRO2160, FLJ31163, FLJ42589	14q32	Materno
<i>DLK1</i>	DLK, FA1, ZOG, pG2, PEF1, Pref-1	14q32	Paterno
<i>PWCR1</i>	PET1, non-coding RNA in the Prader-Willi critical region	15q11.2	Paterno
<i>NDN</i>	HsT16328	15q11.2-q12	Paterno
<i>SNURF</i>		15q12	Paterno
<i>SNORD107</i>	HBII-436, HBII-436 C/D box snoRNA	15q11.2	Paterno
<i>SNORD64</i>	HBII-13, HBII-13 snoRNA	15q12	Paterno
<i>SNORD108</i>	HBII-437, HBII-437 C/D box snoRNA	15q11.2	Paterno
<i>SNORD109B</i>	HBII-438B, HBII-438B C/D box snoRNA	15q11.2	Paterno
<i>MKRN3</i>	D15S9, RNF63, ZFP127, ZNF127, MGC88288	15q11-q13	Paterno
<i>MAGEL2</i>	nM15, NDNL1	15q11-q12	Paterno
<i>SNRPN</i>	SMN, PWCR, SM-D, RT-LI, HCNRN3, SNRNP-N, FLJ33569, FLJ36996, FLJ39265, MGC29886, SNURF-SNRPN, DKFZp762N022, DKFZp686C0927, DKFZp761I1912, DKFZp686M12165	15q11.2	Paterno
<i>SNORD109A</i>	HBII-438A	15q11.2	Paterno
<i>SNORD115@</i>	HBII-52	15q11.2	Paterno
<i>SNORD115-48</i>	HBII-52-48	15q11.2	Paterno
<i>UBE3A</i>	AS, ANCR, E6-AP, HPV6A, EPVE6AP, FLJ26981	15q11-q13	Materno
<i>ATP10A</i>	ATPVA, ATPVC, ATP10C, KIAA0566	15q11.2	Materno
<i>ANKRD11</i>	T13, LZ16, ANCO-1	16q24.3	Materno
<i>TCEB3C</i>	HsT829, TCEB3L2, Elongin A3	18q21.1	Materno
<i>ZIM2</i>	ZNF656	19q13.4	Paterno
<i>PEG3</i>	PW1, ZSCAN24, KIAA0287, DKFZp781A095	19q13.4	Paterno
<i>ZNF264</i>	Zfp264	19q13.4	Materno
<i>SANG</i>	SANG, Nespas	20q13.32	Paterno
<i>BLCAP</i>	BC10	20q11.2-q12	Dependente da Isoforma
<i>NNAT</i>	Peg5, MGC1439	20q11.2-q12	Paterno
<i>L3MBTL1</i>	L3MBTL1, FLJ41181, KIAA0681, H-(L3)MBT, dJ138B7.3, DKFZp586P1522	20q11.2	Paterno
<i>GNASAS</i>	SANG, NESPAS, GNAS1AS, NCRNA00075	20q13.32	Paterno
<i>GNAS</i>	AHO, GSA, GSP, POH, GPSA, NESP, GNAS1, PHP1A, PHP1B, C20orf45, MGC33735, dJ309F20.1.1, dJ806M20.3.3	20q13.3	Dependente da Isoforma

Adaptado de <http://www.geneimprint.com>

INTRODUÇÃO

2.6.1 IGF2 (*Insulin-like growth factor 2*)

O *IGF2*, também conhecido por Somatomedina A, é considerado um factor de crescimento da família das insulinas que tem por funções mediar hormonas de crescimento, estimular o crescimento de células em cultura, estimular a acção da insulina e de uma forma particular tem sido implicado em processos de controlo do crescimento fetal e da placenta.

O gene que codifica para o *IGF2* localiza-se no cromossoma 11, na região p15.5, sendo esta região do cromossoma um dos domínios de genes *imprinted* mais estudados até hoje, uma vez que vários genes *imprinted* conhecidos também se localizam nessa zona. Compreende dois domínios de genes *imprinted*: domínio 1 que inclui os genes *IGF2* e *H19*; domínio 2 que inclui para além dos genes *KCNQ1*, *KCNQ1OT1*, *SLC22A18* também os genes *CDKN1C* e *PHLDA2* (Smith et al., 2007), que vão ser alvo de uma descrição mais detalhada uma vez que constituem um dos objectivos de estudo desta tese. Na figura 7 é possível observar com mais detalhe a organização dos dois domínios de *imprinting* da região p15.5 do cromossoma 11.

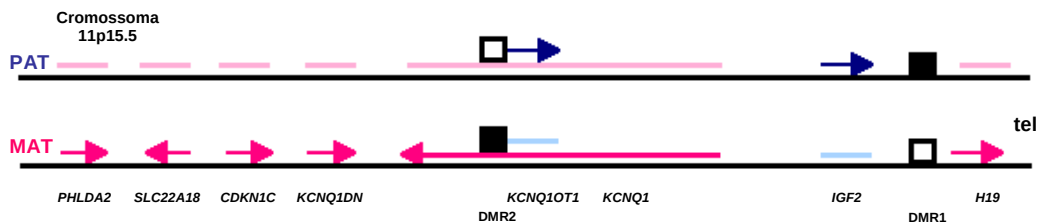


Figura 7. Representação esquemática de cada grupo de genes *imprinted* localizados no domínio 1 (DMR1) e domínio 2 (DMR2) do cromossoma 11p15.5; os genes expressos por via materna estão representados com setas a rosa escuro indicando a direcção de transcrição; as linhas a rosa claro indicam os genes que estão silenciados no alelo paterno; os genes expressos por via paterna estão representados com setas azuis escuras e com linhas azuis claras no caso de estarem silenciados. Os quadrados preenchidos indicam a localização das regiões DMR em estado metilado e os quadrados não preenchidos em estado não metilado; DMR – *Differentially methylated regions*.

INTRODUÇÃO

O *IGF2* é um polipeptídeo com 7.5 kD, que se expressa através do alelo paterno, o que implica que o alelo materno seja *imprinted* ou silenciado. O gene *H19* é expresso por via materna, e a expressão de ambos os genes é regulada por acção da região DMR *H19* ou IC. A existência de metilação diferencial da região DMR *H19* é determinante na regulação da expressão dos genes *H19* e *IGF2*. A região DMR *H19* está normalmente metilada no alelo paterno o que impede a ligação da CTCF, uma proteína *Zinc finger*, que é necessária quando dois genes localizados de forma adjacente, como no caso do *IGF2/H19*, têm padrões de transcrição opostos, de forma a que os mecanismos de activação ou de repressão não interfiram com o gene vizinho (*insulator*) (DeChiara et al., 1990; Smith et al., 2007). O alelo materno estando não metilado permite a ligação à proteína CTCF. Esta ligação bloqueia o acesso a promotores do *IGF2*, sendo o *IGF2* expresso somente pelo alelo paterno, no qual o acesso não está bloqueado pela CTCF (Smith et al., 2007).

2.6.2 *PHLDA2* (*Pleckstrin homology-like domain, family A, member 2, TSSC3, IPL*)

O *PHLDA2* é um gene *imprinted* que se localiza no domínio 2 da região p15.5 do cromossoma 11, no *cluster* de genes, comum ao *IGF2* e *CDKN1C*. Expressa-se pelo alelo materno, ou seja, o alelo paterno está habitualmente silenciado (Feinberg, 1999). Foi descrito pela primeira vez como gene *imprinted* em 1997 com a designação de *IPL* (*Imprinted in Placenta and Liver*) (Qian et al., 1997).

Segundo a literatura, foi-lhe atribuído um papel relevante ao nível do controlo do crescimento fetal e da placenta no rato (Onyango et al., 2000), actuando como um regulador negativo do crescimento (Park et al., 1996). Estudos mais recentes demonstraram que o gene *PHLDA2* deverá ter um papel semelhante na espécie humana (Saxena et al., 2003; McMinn et al., 2006b; Apostolidou et al., 2007). A perda de expressão do gene foi observada em amostras provenientes de Tumores de Wilms o que sugeriu poder ter também uma acção significativa no controlo da formação de tumores (Schwienbacher et al., 2000). A perda de expressão deste gene foi também observada em casos de

INTRODUÇÃO

molares hidatiformes (Saxena et al., 2003). Mais recentemente, McMinn e colaboradores demonstraram que este gene se encontra sobre-expresso na placenta de casos com restrição de crescimento fetal (McMinn et al., 2006b). Em 2007, Apostolidou e colaboradores, demonstraram um aumento da expressão do gene *PHLDA2* em placentas provenientes de crianças com fenótipo Beckwith-Wiedemann (BWS), verificando-se que esta acção era independente de fenómenos de perda de imprinting (LOI – *Loss of Imprinting*). Estes autores propuseram que o gene *PHLDA2* deverá ter um papel determinante no controlo do crescimento, exercendo uma acção negativa sobre o crescimento fetal (Apostolidou et al., 2007).

2.6.3 *CDKN1C* (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C, p57, KIP2)

O *CDKN1C* é um gene *imprinted* que se localiza, tal como o *PHLDA2*, no domínio 2 da região p15.5 do cromossoma 11, no *cluster* de genes, comum ao *IGF2*. Encontra-se expresso por via materna, o que significa que o alelo paterno está *imprinted* (Hatada and Mukai, 1995). Este gene codifica para uma proteína que se sabe inibir vários complexos de G1 ciclinas/CdK, actuando como um regulador negativo da proliferação celular (Lee et al., 1995). Mutações neste gene têm sido implicadas em determinados cancros esporádicos e na BWS, o que o torna um candidato a gene supressor tumoral. Segundo a literatura, cerca de 5% dos pacientes com BWS possuem mutações do gene *CDKN1C* (Romanelli et al., 2009). A perda de metilação na região DMR2 tem sido também associada a uma sub-expressão do gene *CDKN1C* (Weksberg et al., 2005).

Em alguns pacientes com BWS e sem mutações no gene *CDKN1C*, tem sido observado uma forte sub-expressão do gene, sem haver causa molecular aparente (Algar et al., 1999; Diaz-Meyer et al., 2003; Diaz-Meyer et al., 2005). A presença de uma expressão diferencial do gene *CDKN1C* tem sido também observada em casos de pré-eclampsia (Enquobahrie et al., 2008; Knox and Baker, 2007).

2.6.4 *PEG10* (Paternally expressed gene 10)

O gene *PEG10* deriva de um retrotransposição e tem *imprinting* materno, ou seja, é expresso por via do alelo paterno. Foi identificado, em 2001, por Ono et al numa região *imprinted* do cromossoma 7q21 (Ono et al., 2001). Volff et al identificaram o gene *PEG10* como tendo origem na família *Ty3/Gypsy* de retrotransposições, com duas *open reading frames* denominadas RF1 e RF2 cobrindo 61 aminoácidos (Volff et al., 2001). O gene *PEG 10* consiste em dois exões, separados por um intrão com 6,8kb, dando origem a um transcrito de aproximadamente 6,6kb (Volff et al., 2001).

A adaptação e fixação deste retrotransposição no genoma e o facto de estar muito conservado em diferentes espécies argumenta a favor de uma função importante para este gene. Estudos em ratinho mostraram uma expressão elevada do gene *Peg10* durante o desenvolvimento embrionário, nomeadamente entre os dias 9.5 e 16.5 e especificamente na formação do tecido ósseo e cartilágneo. Nos tecidos extra-embrionários foi também observada uma expressão elevada deste gene, em todas as fases entre os dias 7.5 e 17.5 (Clark et al., 2007; Lux et al., 2010).

Este gene poderá ter importância na regulação da proliferação celular, uma vez que foi detectada sobre-expressão do gene em células de fígado de rato em regeneração (Tsou et al., 2003). Em células tumorais de diferentes tipos de cancro foi detectada sobre-expressão ou expressão reduzida (Dekel et al., 2006; Ip et al., 2007; Li et al., 2006) e poderá ainda ter um papel de relevo na morte celular, interferindo com mediadores de apoptose (Okabe et al., 2003). Estudos em ratinho salientaram a importância deste gene na regulação celular, uma vez que o comprometimento do gene *Peg10* resulta em morte embrionária precoce devido a defeitos na placenta (Ono et al., 2006).

OBJECTIVOS

OBJECTIVOS

Os objectivos deste trabalho foram:

- Caracterizar as anomalias cromossómicas presentes em abortamentos espontâneos, mortes fetais ou neonatais, na população portuguesa.
- Optimizar um protocolo sequencial usando as técnicas de citogenética convencional, CGH e FISH de forma a poder caracterizar as anomalias cromossómicas presentes nos abortamentos espontâneos ou mortes fetais, mesmo no caso de falência de cultura celular.
- Aplicar a técnica de MLPA ao estudo dos produtos de abortamento ou mortes fetais, comparando as vantagens e desvantagens da técnica em relação ao cariótipo convencional.
- Validar a técnica de Touch FISH no estudo de produtos de abortamento, nomeadamente na determinação de alterações de ploidia, distinção entre mosaicismo verdadeiro e artefacto de cultura em casos de tetraploidia e identificação de contaminação materna em fetos do sexo masculino.
- Contribuir para o aumento do conhecimento na área do *imprinting* genómico e sua possível relação com a patologia feto-placentária, especificamente na perda de gravidez.
- Avaliar possíveis alterações na expressão de genes *imprinted* em produtos de abortamento ou mortes fetais, em cada trimestre de gravidez.

Por fim, e de uma forma geral, pretendeu-se contribuir para um maior conhecimento das principais causas genéticas do abortamento espontâneo ou da morte fetal, o que poderá permitir um melhor aconselhamento genético/reprodutivo a casais com perda de gravidez recorrentes.

PUBLICAÇÕES

SUB-CAPÍTULO

Estudo citogenético de produtos de abortamento ou tecido fetal. *Protocolos de Medicina Materno-Fetal*, 2008; pp 48.Ed. Lidel.

20

ESTUDO CITOGENÉTICO DE PRODUTOS DE ABORTAMENTO OU TECIDO FETAL**INTRODUÇÃO**

As anomalias cromossômicas estão presentes em mais de 50% dos abortamentos espontâneos e em 5% dos nados-mortos. A realização do cariótipo nos produtos fetais permite conhecer, de um modo sistemático, as alterações citogenéticas que condicionaram a perda fetal, o que permite uma avaliação do risco de recorrência e consequente orientação dos casais.

ENVIO DOS PRODUTOS PARA EXAME CITOGENÉTICO

- 1 – Deverá ser solicitado estudo citogenético em **todas** as situações de interrupção médica da gravidez, morte fetal e abortamentos de repetição.
- 2 – A colheita das amostras deve ser realizada sempre em condições de assépsia (campo, luvas e material de colheita esterilizado).
- 3 – Colher fragmento de placenta próximo do cordão que intercepte todas as camadas.
- 4 – Colher pelo menos um fragmento de pele com 1,0 cm³ de tamanho (calcâneo e coxa). Nos embriões ou fetos pequenos pode ser necessário colher um fragmento de membro.
- 5 – Colocar as amostras nos meios de cultura fornecidos pelo Serviço de Genética (guardados no frigorífico da admissão). Colocar cada fragmento em frascos separados e etiquetar com o tipo de tecido colhido. Verificar o prazo de validade e se o meio de cultura está límpido e sem vestígios de contaminação. Excepcionalmente, pode ser usado soro fisiológico estéril.
- 6 – Ter o cuidado de colocar os frascos com o meio de cultura à temperatura ambiente um pouco antes da biópsia, para não estarem muito frios.
- 7 – Enviar o mais rapidamente possível ao Serviço de Genética. Caso não seja possível o envio no mesmo dia, manter no frigorífico e enviar no dia seguinte o mais cedo possível.
- 8 – Utilizar a requisição do Serviço de Genética.

ARTIGO I

An efficient protocol for the detection of chromosomal abnormalities in spontaneous miscarriages or foetal deaths.

***Eur J Obst Gynecol Reprod Biol.* 2009; 147:144–150.**



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology

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

An efficient protocol for the detection of chromosomal abnormalities in spontaneous miscarriages or foetal deaths

Sofia Dória^{a,*}, Filipa Carvalho^a, Carla Ramalho^b, Vera Lima^a, Tânia Francisco^a, Ana Paula Machado^b, Otília Brandão^c, Mário Sousa^{a,d}, Alexandra Matias^b, Alberto Barros^a^a Department of Genetics, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal^b Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital São João, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal^c Department of Pathology, Hospital São João, Porto, Portugal^d Lab. Cell Biology, Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, University of Porto, Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 November 2008

Received in revised form 25 June 2009

Accepted 31 July 2009

Keywords:

Spontaneous miscarriages

Karyotype

Chromosomal abnormalities

CGH

Touch FISH

ABSTRACT

Objective: Characterization of chromosomal abnormalities in 232 spontaneous miscarriages or foetal deaths using both classical and molecular cytogenetics.**Study design:** Chromosomal abnormalities are responsible for 40–50% of all early pregnancy losses. Conventional cytogenetics is associated with 10–40% of culture failure. Comparative genomic hybridization (CGH) is a DNA-based technique that screens chromosome imbalances in the whole genome and may overcome this problem, although additional methods are required to distinguish between different ploidies, mosaicisms and maternal cell contamination. For a full characterization of chromosomal aberrations in 232 spontaneous miscarriages or foetal deaths we applied a sequential protocol that uses conventional cytogenetics, plus CGH and touch fluorescence in situ hybridization (Touch FISH).**Results:** Successful karyotyping was obtained in 173/232 (74.6%) of the cases, 66/173 (38.2%) of which had an abnormal chromosomal complement. CGH and Touch FISH analyses revealed another 19 abnormal cases in the 63 failures of culture. Overall there were 85/233 (36.6%) cases with an abnormal chromosomal complement, with examples from all three trimesters. Comparing cases, with or without chromosomal abnormalities, no statistical differences were found between women with one or recurrent miscarriages. On the contrary, significant differences were found comparing mean maternal ages or mean gestational ages, in cases with or without chromosomes abnormalities.**Conclusion:** Adopting this sequential protocol, chromosomal complement information was available even in cases with culture failure.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

It has been estimated that about 10–15% of all clinically recognized pregnancies terminate in spontaneous miscarriage (SM), but it is presumed that its overall prevalence is 4–5 times higher [1]. Cytogenetic studies have revealed that foetal chromosome abnormalities account for at least half of the cases before 12 weeks and nearly a third in second trimester miscarriages. Most of these abnormalities comprise numerical chromosomal aberrations (86%), whereas a minority of the cases show structural chromosomal abnormalities (6%) and chromosome mosaicism (8%) [2,3].

Cytogenetic studies of SM or intrauterine foetal deaths (IFD) rely on conventional tissue culture and karyotyping. This technique has known limitations such as culture failure and selective growth of contaminating maternal cells [4–7]. To overcome these problems, short culture of villi in the first trimester specimens [8] and other approaches such as FISH, QF-PCR or multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) have been applied [9,10].

Comparative genomic hybridization (CGH) is another approach and has been applied to the study of SM [6,11–14]. This technique screens imbalances in the whole genome in a single experiment [15,16], and its accuracy and usefulness have been demonstrated in cancer cytogenetics [15]. However, CGH is unable to differentiate between diploid, triploid and tetraploid states. Thus, analysis of the ploidy status should be performed by the complementary use of flow cytometry [6] or interphase fluorescence in situ hybridization (FISH), with the latter also enabling

* Corresponding author at: Department of Genetics, Faculty of Medicine, University of Porto, Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal. Tel.: +351 22 5513647; fax: +351 22 5513648.
E-mail address: sdoria@med.up.pt (S. Dória).

detection of maternal cell contamination, but only in male tissue samples [14]. The efficiency of interphase FISH assays on touch imprints has been previously demonstrated in tumours [17,18]. Using a modified interphase FISH technique, referred to as Touch FISH, we optimized a protocol for the study of frozen miscarriages tissue samples, using the touch preparation method, which consists of a FISH performed directly (without culture) in foetal tissues scrubbed and fixed on a slide.

In the present study we developed a sequential protocol that warranted the achievement of chromosomal complement in all cases with SM or IFD, using conventional cytogenetics, CGH and Touch FISH.

2. Materials and methods

2.1. Study population

Informed consent was obtained from all participants (Genetic Testing and Personal Data Protection National Laws). Tissues from 232 SM or IFD were collected at the Emergency Room/Labour Ward, Hospital São João, Porto, Portugal, during a 30-month period. These were 186 specimens from the first trimester (5–12 weeks of gestation; ovular fragments), 24 from the second trimester (13–24 weeks of gestation; slice of calcaneum or thigh skin) and 22 from third trimester (25–40 weeks of gestation; slice of calcaneum or thigh skin) of pregnancy. All of these cases were related to maternal causes: abortion material from infection or termination pregnancy indications were excluded.

2.2. Cytogenetic analysis

Specimens were collected in a sterile tube containing RPMI 1640 medium (PAA, Haidmannweg, Austria) with Gentamicin (Gibco, Grand Island, New York). After gross examination and clearing of blood clots and mucus, each tissue sample was divided into fragments: one was cultured for cytogenetic analysis and another was frozen and stored at -80°C . Cells were cultured in AmnioMAX™ C100 Basal medium with Supplement (Gibco, Grand Island, New York). Preparation of chromosome slides and G-banding using Leishman stain were performed according to standard methods. The International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) was followed for defining chromosome abnormalities [19].

2.3. Multiple displacement amplification (MDA)

Multiple displacement amplification (MDA) was used in 6 cases due to insufficient genomic DNA available for the CGH experiments. MDA (Repli-g midi kit, Qiagen, Netherlands) was performed using manufacturer's instructions.

2.4. DNA labelling and CGH technique

Briefly, reference and test DNA were labelled with SpectrumRed-dUTP (Abbott, Wiesbaden, Germany) and Spectrum Green-dUTP (Abbott) by nick translation. Subsequently, 1 μg of labelled reference and test samples were mixed with 30 μg of Cot-1 DNA (Gibco) and coprecipitated with ethanol. Denaturation was performed for 5 min at 74°C and the samples were then hybridized in a moist chamber at 37°C for 3 days. Slides were analysed using an epifluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a 100 W mercury lamp and cooled charge-coupled device camera (Sony, Tokyo, Japan) controlled by a Cytovision image analysis system (Applied Imaging International, Sunderland, UK) with HR-CGH software. Standard reference intervals, as described in Kirchhoff et al. (1998) were used with ratio values above 1.25 or

below 0.75, considered to represent chromosomal gains and losses, respectively [20].

2.5. Touch fluorescence in situ hybridization (Touch FISH)

Small frozen pieces of tissue ($2\text{--}3\text{ mm}^3$) were cut and gently touched several times onto poly-L-lysine coated glass slides (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany). Slides were then placed in cold methanol and then in methanol:acetic acid (ratio 3:1), 20 min each. Subsequently, they were incubated in $2 \times \text{SSC}$ (pH 7.0) at 37°C for 10 min and then placed (10 min) in formaldehyde solution (2 ml of 37% formaldehyde, 0.36 g MgCl_2 and 78 ml of PBS, phosphate buffer saline; Sigma, Barcelona, Spain), and rinsed (5 min) in PBS. Slides were then incubated in a pepsin solution (112.5 mg pepsin, 75 ml 0.01N HCl) (10 min), washed in PBS (5 min) and air dried. Dehydration was performed in an ethanol series (70, 96, 100 $^{\circ}\text{C}$, 1 min each).

Alpha-satellite probes for the centromeric regions (CEP probes for chromosomes X, Y, 15, 16 and 18) or locus specific probes (LSI probes for chromosomes 21 or 22) were prepared according to manufacturer's instructions (Abbott). Co-denaturation was performed at 75°C for 3 min, followed by hybridization at 37°C for 4–6 h. Slides were counterstained with DAPI/Vectashield (Vector Laboratories, California, USA) and analysed in a Nikon (Eclipse E-400) epifluorescence microscope fitted with a CCD camera (Sony) and appropriate software (Applied Imaging International).

2.6. Data analysis

Unpaired t-test and Fisher exact test (Chi-square) were used for statistical analysis (StatView for Windows), with the significance level set at $p < 0.05$.

3. Results

A total of 232 samples were studied using a sequential protocol (Fig. 1): 186 (80.2%) cases were from the first trimester, 24 (10.3%) from the second trimester of pregnancy, and 22 (9.5%) from the third trimester. The mean female age was 32.1 years (18–46): 32.6 (19–46) in the first trimester cases, 29.0 (18–39) in the second trimester of pregnancy and 30.7 (19–45) in the third trimester cases.

Excluding 17 cases with no available previous pregnancy information, women with one abortion represented 132/215 (61.4%) of the cases, 53/215 (24.6%) had two abortions, whereas only 30/215 (14.0%) had $\geq$ three abortions.

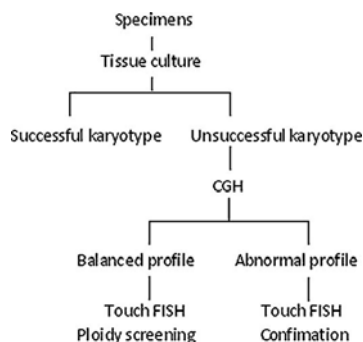


Fig. 1. Flow chart of the sequential protocol used in the study.

Table 1

Conventional cytogenetic results and obstetric history in 66 spontaneous abortions or foetal deaths with abnormal karyotype.

Cases (1 Trim)	Karyotype	Maternal age (years)	Gestational age (weeks)	Previous obstetric history
61674	45,X	30	9	4G2A1TOP
65124	45,X	28	11	2G1A
68094	45,X	30	11	2G1A
70865	45,X	43	8	3G1A1TOP(T21)
72542	45,X	30	8	2G1A
71832	45,X/46,XX	36	9	2G1P
75826	45,X/46,X,+2	33	9	3G2A
77094	45,XY,-21/46,XY	32	8	2G1P
73319	47,XX,+4	26	10	1G
77615	47,XX,+6	36	8	1G(ICSI)
71443	47,XX,+7	31	8	2G1P
71505	47,XY,+7	39	5	3G1P1A
72498	47,XY,+9	40	9	2G1P
75677	47,XY,+9	34	9	1G
76320	47,XY,+9	37	9	4G1P2A
74437	47,XX,+10	28	8	1G
72030	47,XX,+12/46,XX	41	8	5G4P
73787	47,XX,+13	24	7	2G1TOP
72473	47,XX,+13/46,XX	33	11	1G
75225	47,XY,+13	41	9	1G(ICSI)
69697	47,XX,+15	29	11	2G1A
70978	47,XX,+15	32	8	2G1A
67674	47,XY,+15	31	10	1G
70501	47,XY,+15	40	9	2G1A
69801	47,XX,+16	37	9	3G1P1A
70032	47,XX,+16	31	10	1G
71646	47,XX,+16	40	9	5G1P3A
75332	47,XX,+16	34	7	5G1P2A1EP
77268	47,XX,+16	31	6	3G2A
77497	47,XX,+16	36	8	3G2A
78131	47,XX,+16	25	6	1G
71507	47,XY,+16	33	6	3G2P
71910	47,XY,+16	33	8	2G1A
76986	47,XY,+16	29	7	3G2P
68697	47,XX,+21	42	12	3G1P1A
76501	47,XX,+21/48,XX,+21,+mar/46,XX	37	10	2G1A(IVF)
70980	47,XY,+21	41	9	1G
67551	47,XX,+22	29	6	1G
74730	47,XX,+22	34	7	2G1A
76984	47,XX,+22	37	8	2G1P
74900	47,XY,+22	41	8	5G 2P 2A
76488	47,XY,+22	37	8	2G1P
75004	48,XX,+2,+6	25	8	1G
75400	48,XX,+7+13	27	8	1G
74969	48,XY,+20,+21	43	6	3G1P1VTOP
74836	49,XX,+7,+16,+22	44	9	unknown
71941	69,XXX	26	6	2G1A
76041	69,XXX	30	9	1G
76262	69,XXX	31	9	2G1P
76725	69,XXX	31	12	5G 1P 3A (1 with MonosX)
72963	69,XXY	27	8	unknown
73929	69,XXY	30	9	2G1P
72938	92,XXXX	36	9	1G
73398	92,XXXX	29	6	1G
76049	92,XXXX	38	9	2G1EP(IVF)
77178	92,XXXX	28	7	1G
72268	92,XXXX/46,XX	22	8	4G2A1P
71271	92,XXYY	28	6	1G
63620	93,XXXX,+12	35	10	2G1P
70663	47,XX,der(1)/46,XX	38	12	1G
75475	47,XY,+13,t(4;6)(q21.3;p25)	32	12	5G 1P 3A [father with t(4;6)]
75350	46,XX,inv duq(2)(q31q37.3)	25	8	1G
68679	46,XY,der(6)t(4;6)	30	10	4G1P2A
Cases (2 Trim)				
78156	47,XY,+18	20	20	2G1A
Cases (3 Trim)				
64735	47,XY,+13	34	32	1G
75725	46,XY,der(12)/46,XY	29	39	1G

1 Trim: first trimester; 2 Trim: second trimester; 3 Trim: third trimester; G: Gravida; P: para; A: abortion; TOP: termination of pregnancy; T21: Trisomy 21; ICSI: intracytoplasmic sperm injection; EP: ectopic pregnancy; IVF: in vitro fertilization; VTOP: voluntary termination of pregnancy; MonosX: monosomy of the chromosome X.

Table 2
CGH and FISH studies in 59 spontaneous abortions or foetal deaths with culture failure.

Cases (1 Trim)	CGH	FISH	Maternal age (years)	Gestational age (weeks)	Previous obstetric history
76463	XX balanced	–	43	7	unknown
64633	XX balanced	Normal XX	32	10	2G1A
66062	XX balanced	Normal XX	24	9	3G2A
68888	XX balanced	Normal XX	35	10	1G
69963	XX balanced	Normal XX	34	9	2G1A
70253	XX balanced	Normal XY/Normal XX ^a	37	7	1G
70430	XX balanced	–	34	8	4G3A
70659	XX balanced	–	26	11	4G3A
70740	XX balanced	Normal XX	21	9	2G1P
70796	XX balanced	–	39	9	1G
71236	XX balanced	Triploidy XXX	37	7	3G2A
71943	XX balanced	Normal XX	37	9	3G2P
72050	XX balanced	Normal XX	37	12	2G1P
72257	XX balanced	Normal XX	30	10	1G
72561	XX balanced	Normal XX	40	12	2G1P
72766	XX balanced	Normal XX	26	9	unknown
73875	XX balanced	Normal XX	29	8	1G
74927	XX balanced	Normal XX	25	9	1G
75022	XX balanced	Normal XX	34	8	5G 3P 1A
69899	XX balanced	Normal XX	25	7	3G2P
73562	XX balanced	Normal XX	36	12	AI
77991	XX balanced	Normal XX	40	10	1G [mother with t(7;8)]
72294	XX balanced ^a	Triploidy XXY	37	9	4G3A
66005	XY balanced	Triploidy XXY	33	6	3G2A
68006	XY balanced	Normal XY	32	8	2G1P
69906	XY balanced	Normal XY	26	12	2G1P
70661	XY balanced	Normal XY	23	10	2G1A
71302	XY balanced	Normal XY	36	9	4G2P1TOP
71693	XY balanced	–	27	9	unknown
71984	XY balanced	Normal XY	34	11	2G1P
76307	XY balanced	Normal XY	44	9	1G
64030	Monosomy X	Monosomy X	36	9	2G 0P 1A
71750	Monosomy X	Monosomy X	33	9	1G
73228	Monosomy X	Monosomy X	35	10	unknown
74392	XY, gain for X	Triploidy XXY	33	8	1G
75379	XX, gain for 15	Trisomy15,XX	41	9	IVF
78000	XX, gain for 15	Trisomy15,XX	40	7	1G
71398	XX, gain for 15	Trisomy 15, XX	41	7	3G2P
72563	XY, gain for 15	Trisomy 15, XY	44	7	2G1P
73894	XY, gain for 15	Trisomy 15, XY	24	11	1G
77208	XY, gain for 15	Trisomy 15, XY/Normal XX ^a	35	11	2G1P
74504	XY, gain for 15	Trisomy 15, XY	34	8	3G 1A 1EP
76830	XX, gain for 16	Trisomy 16, XX	34	10	unknown
78291	XY, gain for 16	Trisomy 16,XY/NormalXY	24	7	3G2P
77206	XY, gain for 18	Trisomy 18, XY	38	12	4G3P
77584	–	Trisomy 18, XX	38	8	2G1P
Cases (2 Trim)					
70091	XY balanced	–	24	24	1G
70707	XY balanced	–	28	16	3G1P1A
74239	XY balanced	Normal XY	23	24	1G
77270	XY balanced	Normal XY	37	14	3G2P
71706	XX, gain for 21	Trisomy 21, XX	39	15	unknown
Cases (3 Trim)					
62316	XX balanced	Normal XX	36	34	3G2A
63603	XX balanced	Normal XX	34	36	3G1P
65585	XX balanced	Normal XX	24	40	1G
74027	XX balanced	Normal XX	27	27	3G2P
65174	XY balanced	Normal XY	21	28	2G1P
65713	XY balanced	Normal XY	28	35	unknown
67277	XY balanced	Normal XY	31	28	1G
71315	XY balanced	Normal XY	34	39	1G

1 Trim: first trimester; 2 Trim: second trimester; 3 Trim: third trimester; G: Gravida; P: para; A: abortion; TOP: termination of pregnancy; EP: ectopic pregnancy; AI: artificial insemination; IVF: in vitro fertilization;

^a Maternal cell contamination.

Culture failure was observed in 59/232 (25.4%) of the cases: 46/186 (24.7%) from the first trimester, 5/24 (20.8%) from the second trimester and 8/22 (36.4%) from the third trimester. This was shown by the absence of viable cell growth, bacterial/fungal contamination or insufficient metaphases to analyse. Of the 173/232 (74.6%) cases with valid karyotype information, 66/173

(38.2%) were abnormal (Table 1). From these, 63/140 (45.0%) cases were from the first trimester, 1/19 (5.3%) from the second trimester and 2/14 (14.3%) from the third trimester of pregnancy.

The abnormal karyotypes were distributed as follows: 62/66 (93.9%) cases showed numerical abnormalities (36/62 with a single trisomy, 5/62 with double or a triple trisomy, 6/62 with monosomy

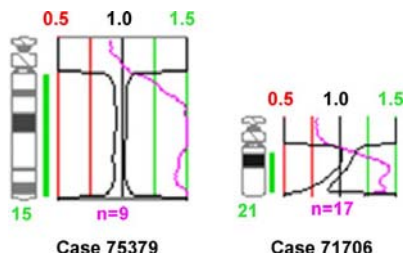


Fig. 2. Comparative genomic hybridization profiles. Green-to-red fluorescence ratio profiles of chromosomes 15 (gain) and 21 (gain) from cases 75,379 and 71,706, respectively (Table 2). The five thin vertical lines represent ratio profile values of 0.5–0.75 (coloured red), 1.0 (coloured black) and 1.25–1.5 (coloured green). Ratio values (pink line) above 1.25 or below 0.75 were considered to represent chromosomal gains and losses, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

X, 13/62 with polyplody, 9/62 with mosaicism and 1/62 with a trisomy plus a balanced translocation). Structural abnormalities were found in 5/66 (7.6%) cases (Table 1).

CGH was performed in 58/59 cases with culture failure because in one case (case 77584, Table 2) there was insufficient DNA from the sample to perform the CGH. Fifteen abnormal profiles were detected (Table 2, Fig. 2). Touch FISH was then applied to evaluate the ploidy status or to confirm the abnormality indicated by CGH. In seven out of 59, Touch FISH experiment was not performed due to insufficient frozen archived tissue. From the 52 cases studied, 19 were abnormal including four new abnormal diagnoses with triploidy (Table 2, Fig. 3). Discrepancies between CGH and FISH techniques were detected in four cases (cases 70253, 71236, 72294 and 66005). In three cases, CGH was not able to detect the ploidy change and in the remaining one, differences were probably due to maternal contamination (Table 2). Thus, in total, CGH and Touch FISH enabled the detection of 19 additional abnormal cases (Table 2).

With the chosen sequential combination of these techniques, all 232 abortion products had a final genetic diagnosis, 147 (63.4%) cases with a normal and 85 (36.6%) with an abnormal karyotype. Of the 85 cases with an abnormal chromosomal complement, 81 (95.3%) were from the first trimester, two (2.4%) were from the second trimester, and two (2.4%) occurred in the third trimester

cases. Most of the chromosomal abnormalities found were numerical aberrations (81/85, 95.3%). Cases with trisomies involved chromosomes 2, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 21 and 22. Double or triple trisomies included the following combinations: 2 + 6, 7 + 13, 20 + 21 and 7 + 16 + 22.

Comparing cases with and without an abnormal chromosomal complement did not reveal any significant differences regarding women with recurrent miscarriage (either with two or $\geq$ three abortions) and women with one abortion. Women having had abortions or foetal deaths with abnormal chromosomal complement had a significantly higher mean age (32.9 years old vs. 31.4 years with a normal chromosomal complement; $p = 0.003$). The mean gestational age was significantly lower in cases with chromosome abnormalities (9.6 weeks vs. 12.6 weeks for cases with normal chromosomal complement; $p = 0.004$).

4. Comment

The karyotype of a spontaneously aborted conceptus provides not only a useful insight in the etiopathogeny of the loss but also valuable clinical information for reproductive and parental genetic counselling, particularly in recurrent SM. Among the many complex causes of SM, chromosomal alterations are considered to be the most common etiological factor, and especially in the first half of the pregnancy. Cytogenetic studies rely on obtaining viable tissue for karyotyping. Consequently, the impossibility of obtaining information due to technical problems associated with classical methods impairs the ability to provide complete and thorough counselling.

Culture failure was present in 25.4% of cases. To solve this problem, we established an efficient sequential protocol for the detection of chromosomal aberrations in SM or IFD. Frozen material from culture failure was analysed by CGH and interphase Touch FISH. With the sequential combination of these techniques, all 232 abortion products were given a final diagnosis, 63.4% cases with a normal and 36.6% with an abnormal chromosomal complement. The number of cases studied here was quite sufficient to evaluate the new protocol efficiently, and was not intended for use as a comparison with large scales series of spontaneous miscarriages cases.

In the present study, CGH enabled the detection of 15 additional abnormal profiles, 14 in the first trimester and one in the second trimester. However, another technique is required since 10% of early foetal losses may be due to polyplodies, and CGH is unable to detect these [6,12]. This is because signal ratios are normalized

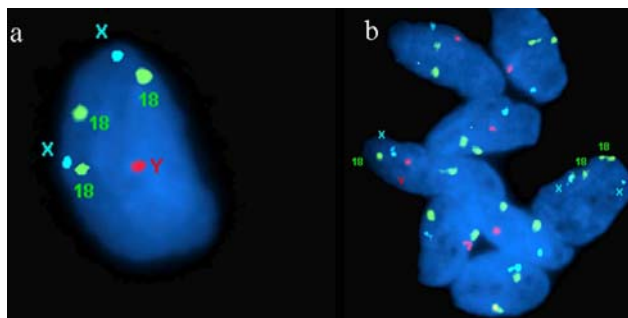


Fig. 3. Touch fluorescence in situ hybridization. Centromeric probes to chromosomes X (blue), Y (red) and 18 (green). (a) Case 72294 – triploidy XXY; (b) Case 70253 – cells with an XX complement confirm maternal cell contamination in a male foetus. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

over the whole chromosome complement. Additionally, CGH, does not detect low-grade mosaicisms or balanced structural anomalies. In fact, the capacity of CGH to detect mosaicism has been shown to be only for cases with more than 32% mosaicism [21]. The presence of high levels (60–70%) of maternal cells in a tissue sample may also render CGH analysis ineffective in the determination of a foetal aneuploidy or in the identification of a male foetus [6,22]. The major advantage of CGH is that it does not require prior knowledge of the genetic constitution of the test sample and that it analyses the entire genome in a single experiment, thereby overcoming the specificity of highly focused techniques such as MLPA for aneuploidy detection or QF-PCR, which analyses specific chromosomes. However, subtelomeric MLPA, which contains different probes for all the chromosomes, has been proved to be a reliable cost-effective technique [9].

Touch FISH may represent the ideal approach to be used as an additional tool after CGH approach, because is highly efficient in detecting low-grade (<5%) mosaicism, and is also useful in evaluating the existence of maternal cell contamination, a frequent problem during karyotyping and CGH analyses.

In the present study, Touch FISH enabled the detection of 19 abnormal profiles, including three triploidies that were not detected by CGH. Discrepancies between the two techniques were detected in four cases, three of which corresponded to cases of triploidy and one to maternal cell contamination. Thus, in total, CGH and Touch FISH enabled the detection of 19 additional abnormal cases. In these samples, Touch FISH, which uses a huge panel of probes, would have been sufficient to detect all numerical chromosomal abnormalities and therefore would be more cost-effective than the use of CGH (complemented by FISH). In spite of this, it is important to stress that structural chromosomal abnormalities could remain undetected, and this is one of main reasons to perform karyotype analysis in spontaneously aborted material from couples with recurrent miscarriages.

In accordance with previously published data, most of the chromosomal abnormalities found were numerical aberrations (93.9%), due to trisomy (60%), monosomy X (10%), polyploidy (21%) and mosaicism (9%) [2,6,13].

Of the cases with a normal chromosomal complement, there was an excess of female foetuses (96/147, 65.3%; ratio 1.9), which is in accordance with previous reports [5,22–24]. Various factors may influence the sex ratio in cytogenetic studies, particularly the type of tissue sample cultured, the different proportion of maternal tissue contamination and the overgrowth by maternal cells in cultures [24]. Other authors examined the incidence of maternal cell contamination by karyotyping SM samples with both direct and long-term culture methods, concluding that as many as 30–40% of the 46,XX karyotypes from cultured samples may represent maternally derived cells [24,25]. Although maternal cell contamination may be a major reason for the low incidence (36.6%) of abnormal chromosomal complements in the present population with SM, a careful technique was used for the correct separation of foetal and maternal tissues, selecting only foetal tissue and removing maternal decidua and blood clots. Other reasons could be related to the fact that we have included samples from all three trimesters of pregnancy. Specific analysis of the first trimester cases showed chromosomal abnormalities in 43.5% of the cases.

Abortion products showing a chromosomal abnormality were associated with a higher maternal age [26,27], with its frequency seeming tightly related to the gestational age at demise [28,29]. Using stratified population-based data, other authors also observed an association between repeated abortions and abnormal chromosomal profiles of the losses [28,30]. In the present study, comparisons between cases with and without an abnormal chromosomal complement did not reveal any significant differences regarding women with recurrent miscarriage. On the

contrary, advanced maternal age and a lower gestational age were more prevalent in cases with chromosomal abnormalities, in good agreement with the literature [26,27].

In conclusion, the use of CGH and Touch FISH in cases that failed to grow in culture during conventional karyotyping enabled the establishment of the chromosomal complement in all tissues retrieved from spontaneous abortion materials, besides identifying the cases where maternal contamination might lead to misleading clinical information. We believe that this sequential combination of these three techniques provides an efficient tool for the characterization of chromosomal abnormalities in SM and IFD, which should contribute not only to additional knowledge on the frequency of chromosomal aberrations but also should improve genetic and reproductive parental counselling.

Acknowledgement

We thank Dr. David Stevenson for the English language revision.

References

- [1] Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet* 2006;68:601–11.
- [2] Goddijn M, Leschot NJ. Genetic aspects of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000;14(5):855–65.
- [3] Azmanov DN, Milachich TV, Zaharieva BM, et al. Profile of chromosomal aberrations in different gestational age spontaneous abortions detected by comparative genomic hybridization. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol* 2007;131:127–31.
- [4] Griffin DK, Millie EA, Redline RW, Hassold TJ, Zaragoza MV. Cytogenetic analysis of spontaneous abortions: comparison of techniques and assessment of the incidence of confined placental mosaicism. *Am J Med Genet* 1997;72(3):297–301.
- [5] Bell KA, Van Deerlin PG, Haddad BR, Feinberg RF. Cytogenetic diagnosis of "normal 46 XX" karyotypes in spontaneous abortions frequently may be misleading. *Fertil Steril* 1999;71(2):334–41.
- [6] Lomax B, Tang S, Separovic E, et al. Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions. *Am J Hum Genet* 2000;66:1516–21.
- [7] Lebedev IN, Ostroverkhova NV, Nikitina TV, Sukhanova NN, Nazarenko SA. Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis. *Eur J Hum Genet* 2004;12(7): 513–20.
- [8] Morales C, Sánchez A, Bruhuera J, et al. Cytogenetic study of spontaneous abortions using semi-direct analysis of chorionic villi samples detects the Broader spectrum of chromosome abnormalities. *Am J Med Genet* 2008; 146A:66–70.
- [9] Bruno DL, Burgess T, Ren H, et al. High-throughput analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using an MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for polyploidy. *Am J Med Genet* 2006;140A(24): 2786–93.
- [10] Diego-Alvarez D, García-Hoyos M, Trujillo MJ, et al. Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages. *Hum Reprod* 2005;20(May (5)): 1235–43.
- [11] Bryndorf T, Kirchhoff M, Rose H, et al. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am J Hum Genet* 1995;57(5):1211–20.
- [12] Daniely M, Aviram-Goldring A, Barkai G, Goldman B. Detection of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 1998;13:805–9.
- [13] Levy B, Dunn TM, Kaffe S, Kardon N, Hirschhorn K. Clinical applications of comparative genomic hybridization. *Genet Med* 1998;1:4–12.
- [14] Lestou VS, Desilets V, Lomax BL, Barrett JJ, et al. Comparative genomic hybridization: a new approach to screening for intrauterine complete or mosaic aneuploidy. *Am J Med Genet* 2000;92:281–4.
- [15] Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular analysis of solid tumors. *Science* 1992;258:818–21.
- [16] Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, et al. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromos Cancer* 1994;10:231–43.
- [17] Belaud-Rotureau MA, Meunier N, Eimer S, Vital A, Loiseau H, Merlio JP. Automated assessment of 1p36-19q13 status in gliomas by interphase FISH assay on touch imprints of frozen tumours. *Acta Neuropathol (Berl)* 2006;111(3):255–63.
- [18] Scheie D, Andresen PA, Cvancaova M, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) on touch preparations: a reliable method for detecting loss of heterozygosity at 1p and 19q in oligodendroglial tumors. *Am J Surg Pathol* 2006; 30(7):828–37.
- [19] Shafer LG, Tommerup N. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: Karger. *Cytogenet Genome Res* 2005.

- [20] Kirchhoff M, Gerdes T, Rose H, Maahr J, Ottesen AM, Lundstenn C. Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry* 1998;31:163–73.
- [21] Lomax BL, Lestou VS, Barrett IJ, Kalousek DK. Confined placental mosaicism for chromosome 7 detected by comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn* 1998;18:752–4.
- [22] Lestou VS, Lomax BL, Barrett IJ, Kalousek DK. Screening of human placentas for chromosomal mosaicism using comparative genomic hybridization. *Teratology* 1999;59:325–30.
- [23] Hassold T, Chen N, Funkhouser J, et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 1980;44:151–78.
- [24] Bartels I, Hansmann I, Eiben B. Excess of females in chromosomally normal spontaneous abortuses. *Am J Med Genet* 1990;35(2):297–8.
- [25] Jarrett KL, Michaelis RC, Phelan MC, Vincent VA, Best RG. Microsatellite analysis reveals a high incidence of maternal cell contamination in 46 XX products of conception consisting of villi or a combination of villi and membranous material. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185(1):198–203.
- [26] Hassold T, Warburton D, Kline J, Stein Z. The relationship of maternal age and trisomy among trisomic spontaneous abortions. *Am J Hum Genet* 1984;36(6):1349–56.
- [27] Nagaishi M, Yamamoto T, Iinuma K, Shimomura K, Berend SA, Knops J. Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan. *J Obstet Gynaecol Res* 2004;30(3):237–41.
- [28] Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Human Reprod* 2002;17(2):446–51.
- [29] Stephenson M, Kutteh W. Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol* 2007;50(1):132–45.
- [30] Hassold T, Chiu D. Maternal age specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet* 1985;70:11–7.

ARTIGO II

Aneuploidies detection in miscarriages and foetal deaths using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification: an alternative to speeding up results?

***Eur J Obst Gynecol Reprod Biol*, 2010 (doi:10.1016/j.ejogrb.2010.06.022)**



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Obstetrics & Gynecology and
Reproductive Biologyjournal homepage: www.elsevier.com/locate/ejogrb

Aneuploidies detection in miscarriages and fetal deaths using multiplex ligation-dependent probe amplification: an alternative for speeding up results?

Berta Carvalho^a, Sofia Dória^a, Carla Ramalho^b, Otília Brandão^c, Mário Sousa^d, Alexandra Matias^b,
Alberto Barros^a, Filipa Carvalho^{a,*}^a Department of Genetics, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal^b Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital S. João, Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal^c Department of Pathology, Hospital S. João, Porto, Portugal^d Laboratory of Cell Biology, Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, University of Porto, Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 January 2010

Received in revised form 31 May 2010

Accepted 30 June 2010

Keywords:

MLPA

Aneuploidies

Prenatal rapid testing

Miscarriages

Fetal karyotype

ABSTRACT

Objective: The aim of this prospective study was to apply the MLPA technique to products of miscarriages and fetal deaths in order to detect the more frequent chromosome aneuploidies and compare the results to conventional karyotyping.**Study design:** Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) is a relatively new molecular technique for targeted detection of common chromosomal aneuploidies, namely trisomy 13, 18, 21 and sex chromosomal abnormalities. The reliability and high accuracy of this technique constitute an alternative for rapid results in large scale testing. In this study, a total of 489 DNA samples from fetal tissue were used for aneuploidy detection of chromosomes 13, 18, 21, X and Y using a commercial MLPA kit (SALSA P095) and were simultaneously subjected to conventional karyotyping.**Results:** MLPA was the only result available in 33% of the cases. A cytogenetic result was obtained in only 328/489 samples. MLPA detected 7.8% of chromosome aneuploidies. Among the total samples karyotyped, MLPA failed to detect some aneuploidies and the false-negative rate was 0.82%. As expected, ploidy changes and reciprocal translocations were not detected by this technique, but MLPA gave a conclusive result even in cases of mosaicism.**Conclusion:** The present data confirm that MLPA is a rapid, simple and reliable method for detection of chromosome 13, 18, 21, X and Y abnormalities in fetal tissue.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Spontaneous miscarriages are the most recurrent complication in first trimester pregnancies [1]. About 65% of all conceptions and 15% of clinically recognized pregnancies terminate in pregnancy loss [2]. Recurrent miscarriage is defined as the occurrence of three or more consecutive pregnancy losses and affects 1% of women [1]. The etiology of spontaneous miscarriages is often unknown and may be multifactorial [1]. Frequently the causes are related to chromosomal abnormalities, anatomical factors, thrombophilia, infections, placental anomalies, metabolic and immune disorders, but in 20–50% of cases the cause remains unclarified [3–5]. More than 50–70% of first trimester spontaneous miscarriages are due to chromosomal abnormalities, and about 95% of these are due to

autosomal aneuploidies [6–9]. Among these, the most common trisomies observed involve chromosomes 16, 21 and 22 [9,10]. The majority of chromosomal abnormalities detected in spontaneous miscarriages occur *de novo* and result from random errors produced during gametogenesis and embryonic development [7]. Advanced maternal age is an important factor that must be related to chromosomal non-disjunction, especially on maternal first division of meiosis [1,8,11]. Paternal meiotic errors have also been described as potentially responsible for fetal trisomies due to an increased rate of sperm-cell aneuploidy [12].

Cytogenetic studies are highly recommended in spontaneous miscarriage analysis, but they entail some drawbacks such as culture failure, bacterial or fungal infection of the sample or maternal cell contamination that may affect 10–40% of the cytogenetics results [13,14]. Molecular cytogenetics techniques, such as fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and quantitative fluorescent PCR (QF-PCR) are reliable diagnostic methods for aneuploidy detection and have successfully reduced the turn-around time for diagnosis [9,14,15]. However, these techniques are limited to the number of target chromosomes that can be tested

* Corresponding author at: Department of Genetics, Faculty of Medicine, University of Porto, Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal. Tel.: +351 22 551 36 47; fax: +351 22 551 36 48.
E-mail address: filipac@med.up.pt (F. Carvalho).

per assay and are still too expensive, especially FISH [15,16]. In contrast, MLPA, first described by Schouten et al. [17], is a quantitative method based on probe relative quantification of up to 40 different genomic sequences.

The aim of this prospective study was to apply the MLPA technique (SALSA P095) to products of miscarriages and fetal deaths in order to detect the more frequent chromosome aneuploidies and compare the results to conventional karyotyping.

2. Materials and methods

2.1. Biological samples

From January 2005 to July 2009, material from a total of 489 miscarriages and fetal deaths was referred to the Department of Genetics of the Faculty of Medicine of the University of Porto for MLPA and for conventional cytogenetic G-banding analysis. Specimens consisted of ovular fragments and slices of calcaneum or thigh skin, fresh or paraffin-embedded, obtained after misoprostol or surgical evacuation.

The study was performed on samples between 5 and 38 weeks of gestation (mean 21.5 weeks of gestation) from 17 to 43 years old (mean 30 years old) pregnant women.

2.2. Data analysis

Data derived from personal and familial antecedents, gravidity, parity, number of live births, and gestational age, were introduced prospectively into the computerized StatView Database. Statistical analysis was performed using Fisher's exact test in a 2×2 crossover design and *t*-test calculator (GraphPad Software).

2.3. Tissue preparation and DNA extraction

Samples were collected into a sterile falcon flask containing RPMI 1640 medium (PAA, Haidmannweg, Austria) with 1X Antibiotic-Antimycotic (Gibco, Invitrogen, CA, USA). Villi or fetal tissue were examined and dissected free from any maternal decidua or blood clots and repeatedly washed in sterile phosphate-buffered saline solution to avoid maternal cell contamination. Samples were digested in RPMI-1640 medium (PAA, Haidmannweg, Austria) with 0.5% gentamicin and supplemented with 20% fetal bovine serum and 0.3% collagenase (GIBCO, Invitrogen, CA, USA) during 4 h prior to culturing. Culture was performed with AmnioMAX™-C100 basal medium (Invitrogen, CA, USA) containing 0.5% gentamicin and 200 mM L-glutamine (GIBCO, Invitrogen, CA, USA) following standard protocols. Conventional GTL-banding karyotype was performed and a minimum of 15 metaphase cells were counted and five metaphases completely analysed per specimen.

DNA extraction was performed on cells from supernatant cultures using a Ready Amp Genomic DNA Purification System Kit (Promega, Madison, USA) in order to perform molecular studies.

2.4. MLPA analysis

The MLPA kit (SALSA P095), used to detect the most frequent aneuploidies, includes 36 genomic targets, eight probes for chromosomes 13, 18, 21 and X, and four probes for Y chromosome (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) (www.mrc-holland.com). MLPA reaction was performed in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The MLPA peak areas were then exported to a Microsoft Excel datasheet to calculate the relative peak areas of the amplified probes as a fraction of the total sum of peak areas [18].

3. Results

The MLPA technique was performed in 489 miscarriage or fetal death DNA samples, producing a result within 24 h. From 489 cases, 92.3% (451/489) were spontaneous miscarriages and 7.7% (38/489) were intra-uterine fetal deaths. There are several risk factors known to be involved in spontaneous miscarriages, but in the majority of the 451 spontaneous miscarriages and in the 38 fetal deaths, the clinical history was irrelevant. In only 22 cases something abnormal could be identified: 13 were referred as hydatidiform mole and nine cases revealed ultrasound anomalies. The majority of miscarriage samples analysed, 97.1% (438/451), derived from culture supernatant or fresh samples and only 2.9% (13/451) were paraffin-embedded samples. All the samples from fetal deaths were derived from culture supernatant.

MLPA gave a conclusive result in all the samples analysed. In 33% of the cases (161/489) the MLPA result was the only result available. From these cases, in which a conventional karyotype was not obtained, 8.1% (13/161) were chromosomally abnormal. Overall, MLPA detected chromosome aneuploidies in 7.8% (38/489) of cases. These included trisomy 21 ($n = 11$), monosomy X ($n = 11$), trisomy 18 ($n = 6$), trisomy 13 ($n = 4$), triploidy XXY ($n = 4$), monosomy 21 ($n = 1$) and a male with extra Y ($n = 1$). Typical profiles for normal and abnormal samples are shown in Fig. 1. Out of 489 cases analysed by MLPA, two cases of 69,XXY, one case with a double trisomy 7 and 13, and one case with a double trisomy 20 and 21 were missed, corresponding to a false-negative rate of 0.82%. These four cases were from ovular fragments and probably were contaminated with maternal DNA (Table 1). Conventional karyotyping was successfully achieved in 67% (328/489) of cases. In 33% (161/489) failed cell culture was due to misgrowth or bacterial/fungi infection in the first 24 h of culture. Chromosome analysis revealed 29.9% (98/328) of cases with chromosome abnormalities, from which 92.9% (91/98) were aneuploidies and 7.1% (7/98) were structural alterations. In 60 cases, previously diagnosed as normal by MLPA, conventional karyotype revealed chromosome abnormalities involving other chromosomes. Among the other trisomies detected, trisomy 16 was the most frequent aneuploidy (Table 1). The male/female ratios in the 391 euploid samples and in the 54 single trisomic samples studied were 1:2.4 and 1:1.1, respectively (Table 1).

From all 489 cases, 10 miscarriage samples were clearly contaminated by maternal blood and the MLPA result appeared discordant from the conventional karyotype. Cytogenetic analysis showed normal XX karyotypes but MLPA revealed the presence of male material with a low Y:X ratio suggesting maternal contamination.

The distribution of the samples by gestational age showed that 76.5% (374/489) were from the 1st trimester (≤ 12 weeks gestation), 17.9% (88/489) from the 2nd trimester (13–24 weeks gestation) and 5.5% (27/489) from the 3rd trimester (≥ 25 weeks gestation). When chromosomal abnormalities were analysed according to the gestational age of the samples, 22.9% (86/374) of first trimester losses, 12.5% (11/88) of second trimester losses and 3.7% (1/27) of third trimester were chromosomally abnormal (Table 2). Data showed that chromosomally abnormal cases are significantly more common in first trimester than in second/third trimester ($P = 0.0032$). Among the 489 cases studied, culture failure was observed in 34.2% (128/374) from first trimester cases, 27.3% (24/88) from the second trimester and 33.3% (9/27) from the third trimester. No significant differences were obtained when culture failure was compared with gestational age.

Results from routine anatomo-histopathologic examinations revealed that signs of inflammation/infection were more strongly associated with second and third trimester cases ($P = 0.0001$) (Table 2). The anatomo-histopathologic findings of infection/

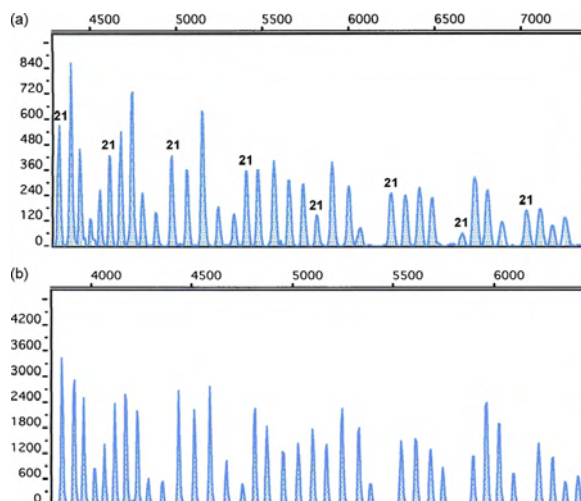


Fig. 1. Electropherograms showing MLPA products for SALSA P095 kit. Aneuploidy appears as a 35–50% variation in the relative peak area of amplification product of all probes for that chromosome relatively to the other chromosomes; (a) 45,XY,-21/46,XY karyotype, showing a decrease in the areas of the peaks corresponding to chromosome 21; (b) 46,XY karyotype. X-axis shows the length of the PCR products in base pairs, labelled with 6-FAM and Y-axis shows the fluorescence intensity in arbitrary units.

inflammation revealed no association with cell culture failure ($P = 0.7577$).

Overall, in this study the mean maternal age with spontaneous miscarriages was 30 years (range to 17–43). When data from maternal age was analysed according to the chromosome aneuploidy, trisomy 21 was clearly associated with advanced maternal age (Table 3).

From the 489 cases, 20 cases were from assisted reproductive techniques, and 35% (7/20) of these were chromosomally abnormal ($P = 0.0934$).

In this study, 11% (54/489) of the women had an obstetric history of first trimester recurrent spontaneous miscarriages (≥ 3 spontaneous miscarriages). Of these, 25.9% displayed at least one conception product with an abnormal chromosomal complement, mostly aneuploidies. No statistically significant differences were found in chromosomal abnormalities when sporadic (84/435, 19.3%) were compared with recurrent (14/54, 25.9%) miscarriages.

4. Comment

Numerical chromosomal abnormalities are the most frequent cytogenetic anomalies found in spontaneous miscarriages [9,19]. MLPA SALSA aneuploidy probe mix (P095) was performed on 489 DNA samples in order to detect chromosomal aneuploidies of chromosomes 13, 18, 21 and sex chromosomes. MLPA gave a conclusive result in all samples analysed and detected 7.8% of aneuploidies, but the MLPA P095 kit has no capability to detect aneuploidies other than those affecting chromosomes 13, 18, 21, X and Y. As previously reported, the use of a combination of MLPA P036 and P070 SALSA kits may increase the possibility of detecting all chromosomal trisomies as well as unbalanced terminal chromosomal rearrangements in miscarriages, because it allows the analysis of all chromosomal changes using probes for the subtelomeric regions [20,21]. In this series chromosomal abnormalities were detected in 29.9% of the cases, 92.9% of which were

chromosome aneuploidies, in agreement with the literature [19]. Conventional karyotyping detected 56 more cases with chromosomal abnormalities in the first trimester, three more cases in the second trimester and one in the third trimester, respectively, which is in accordance with literature that describes using the MLPA technique together with cytogenetics and other molecular techniques as a more refined and complete diagnosis [20]. Our cytogenetic data showed 9.2% of mosaic cases with two or more cell lines. In this series, MLPA was able to detect all cases with two or more cell lines, which emphasizes the capability of MLPA to detect mosaicism that is dependent on the prevalence of aneuploid cell lines [20]. Conventional karyotyping confirmed the monosomy of chromosome 21, firstly detected by MLPA, in a mosaic case (45,XY,-21/46,XY). However, the MLPA technique has some limitations in detecting ploidy changes, structural rearrangements and small insertions or deletions, leading to a missed detection rate of 7.1% (7/98) of structural abnormalities and 35.7% (35/98) single trisomies, other than 13, 18, 21, X and Y chromosomes.

In 33% of the cases it was not possible to analyse the karyotype due to culture failure, which is in accordance with the literature that reports high rates of culture failure (10–40%) [13]. Culture failure rates were not statistically different when distributed by gestational trimester of the cases ($P \approx 1.000$), in accordance with a previous report [9]. This fact highlights the importance of the MLPA technique in cases of culture failure and moreover the efficiency of the method was demonstrated not to be influenced by gestational age.

Likewise, the use of DNA instead of cultured material represents a benefit especially in macerated tissues or in paraffin-embedded specimens or ethanol-fixed samples [22]. Fifty-five percent (21/38) of the aneuploid cases detected by MLPA were from women with advanced maternal age (≥ 35 years old). In this series trisomy 21 ($n = 11$) was clearly associated with advanced maternal age (Table 3). This is a well known fact and it might be the only factor that significantly increases the risk of aneuploidies, mainly trisomies [19]. In this study, 25.9% of women with recurrent

Table 1

Data obtained by MLPA technique and conventional cytogenetics.

MLPA (489)	Conventional cytogenetics	karyotype (not detected by MLPA) (64)	Culture failure (161)
	Karyotype (same chr. 13, 18, 21, X and Y analysed) (264)		
Normal XX (313)	46,XX (178)	47,XX,+4 (1) 47,XX,+6 (1) 47,XX,+7 (2) 47,XX,+10 (1) 47,XX,+15 (3) 47,XX,+16 (6) 47,XX,+22 (4) 48,XX,+2,+6 (1) 48,XX,+7,+13 (1) ^a 49,XX,+7,+16,+22 (1) 47,XX,+12/46,XX (1) 47,XX,der(1)/46,XX (1) 69,XXX (6) 92,XXX (5) 92,XXX/46,XX (2) 46,XX,invdup(2) (q31q37.3) (1) 46,XX,t(5;7) (1)	Culture failure (97) ^b
Normal XY (138)	46,XY (65)	47,XY,+7 (1) 47,XY,+9 (5) 47,XY,+15 (3) 47,XY,+16 (5) 47,XY,+22 (2) 48,XY,+20,+21 (1) ^a 46,XY,der(6)t(4;6)pat (1) 46,XY,der(12)/46,XY (1) 69,XXY (2) ^a 92,XXYY (1)	Culture failure (51) ^b
Monosomy X (11)	45,X (6)	45,X/46,XX (1) 46,X,+2/45,X (1)	Culture failure (3) ^b
Trisomy 21 (11)	47,XX or XY,+21 (5)	46,XX,+21/48,XX,+21,+mar/46,XX (1)	Culture failure (5) ^b
Trisomy 18 (6)	47,XX or XY,+18 (3)		Culture failure (3) ^b
Trisomy 13 (4) Triploidy (4)	47,XX or XY,+13 (3) 69,XXY (3)	47,XY,t(4;6),+13 (1)	Culture failure (1) ^b
Monosomy 21 (1) Male with extra Y (1)	45,XY,-21/46,XY (1)		Culture failure (1) ^b

^a False-negative results.^b Cases only detected by MLPA, without karyotype due to culture failure.

miscarriages had at least one chromosomally abnormal miscarriage in the first trimester. The aneuploidy incidence in recurrent miscarriages as compared with sporadic cases may indicate an alternative mechanism responsible for the majority of recurrent miscarriages [19]. Another interesting finding was the rate of chromosomal aneuploidies in couples using assisted reproductive techniques – 35%. This association was not statistically significant and similar previous results showed no increased cytogenetic risk in couples who underwent assisted reproductive techniques [23].

The occurrence of intra-uterine inflammation/infection seems to be particularly frequent in the second and third trimester cases. Amniotic fluid infections are a major cause of midgestation fetal loss, particularly in cases without clinical signs of sepsis [24].

Routine anatomic-histopathological examination of products of conception provides additional information to determine the cause of the miscarriage. In this series, the association between inflammation/infection and late fetal death was statistically significant. Conventional karyotyping confirmed MLPA results for the most common aneuploidies, however there were 0.82% of false-negative results. These four cases were ovular fragments from the first trimester and were probably contaminated with maternal decidua. In this study we could also demonstrate that maternal cell contamination led to discordant results, because in 10 cases MLPA detected the presence of Y chromosome and in conventional karyotyping only female metaphases were observed. The rate of normal female karyotypes obtained is another point of

Table 2

Culture failure, chromosomal abnormalities and anatomic-histopathologic findings according to the gestational age.

	First trimester (n=374)	Second trimester (n=88)	Third trimester (n=27)
Culture failure	34.2% (128/374)	27.3% (24/88)	33.3% (9/27)
Chromosomal abnormality	22.9% (86/374)	12.5% (11/88)	3.7% (1/27)
Inflammation/Infection	25.9% (97/374)	59.1% (52/88)	40.7% (11/27)

Please cite this article in press as: Carvalho B, et al. Aneuploidies detection in miscarriages and fetal deaths using multiplex ligation-dependent probe amplification: an alternative for speeding up results? Eur J Obstet Gynecol (2010), doi:10.1016/j.ejogrb.2010.06.022

Table 3

MLPA aneuploidies distribution according to maternal and gestational age.

	Mean Maternal age years (SD)	Mean Gestational age weeks (SD)
Trisomy 13	32.5 (24–41)	10 (7–12)
Trisomy 18	33.8 (20–43)	13.7 (11–20)
Trisomy 21	38.2 (33–42)	11.9 (5–18)
Monosomy X	34.4 (30–43)	9.5 (8–11)
Monosomy 21	32	12
Triploidy	30.5 (27–33)	10.3 (8–14)
Male with extra Y	40	9

concern. According to the literature there is a propensity for maternal cell growth rather than fetal cells or a selective loss of early gestation female conceptuses probably related to extremely high (<90%) skewed X chromosome inactivation [25,26]. Some authors suggest that rates of abnormalities seen by conventional karyotyping may be more frequent than reported in the literature, probably due to *in vitro* preferential overgrowth of maternal cells considering that the removal of any maternal decidua is not always possible [4,5,27,28]. Using MLPA, maternal cell contamination can also hinder the identification of 69,XXY specimens because the profiles will be similar: ratios between chromosomes X and Y, and between autosomes and chromosome X, will be close to 1.5 while ratios between autosomes and Y will be close to 2.0.

In recent years, the MLPA technique has become an important tool for aneuploidy analysis. In several countries the debate has been open in order to discuss the replacement of traditional karyotyping by rapid aneuploidy tests for women at risk for Down syndrome. MLPA provides a promising stand-alone test for the rapid detection of the most frequent aneuploidies. The MLPA technique has advantages compared to QF-PCR, allowing the detection of aneuploidies for all chromosomes analysed, in just one PCR reaction, using only one pair of primers.

As genetic diagnosis provides important information for counselling in future pregnancies, and a diagnosis can have an emotional benefit to the couple, this study reinforces our previous finding and strengthens the possibility of rapid screening for the more common aneuploidies in products of conception [6,8,9]. These results provide further evidence to consider MLPA as a rapid, economic, automated, reliable and accurate method to study aneuploidies both in fresh tissues and in paraffin-embedded products, that does not require culturing cells, or living cells, and the amounts of DNA required for MLPA analysis are very low. The use of MLPA for aneuploidy detection in spontaneous miscarriages, together with conventional and molecular cytogenetic techniques can be very helpful in establishing a rapid diagnosis, especially in cases of culture failure.

Acknowledgment

This study was partially support by a Project from the Portuguese Ministry of Health.

References

- [1] Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet* 2006;368:601–11.
- [2] Warburton D, Sussner M, Stein Z, Kline J. Genetic and epidemiologic investigation of spontaneous abortion: relevance to clinical practice. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1979;15:127–36.
- [3] Many A, Schreiber L, Rosner S, Lessing JB, Eldor A, Kupfermink MJ. Pathologic features of the placenta in women with severe pregnancy complications and thrombophilia. *Obstet Gynecol* 2001;98:1041–4.
- [4] Hogge WA, Byrnes AL, Lanasa MC, Surti U. The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:397–402.
- [5] Sullivan AE, Silver RM, LaCourse DY, Porter TF, Branch DW. Recurrent fetal aneuploidy and recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol* 2004;104:784–8.
- [6] Wolf GC, Horger EO. Indications for examination of spontaneous abortion specimens: a reassessment. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:1364–8.
- [7] Rubio C, Pehlivan T, Rodrigo L, Simón C, Remohi J, Pellicer A. Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview. *Am J Reprod Immunol* 2005;53:159–65.
- [8] Diego-Alvarez D, Ramos-Correales C, Garcia-Hoyos, et al. Double trisomy in spontaneous miscarriages: cytogenetic and molecular approach. *Hum Reprod* 2006;21(4):958–66.
- [9] Dória S, Carvalho F, Ramalho C, et al. An efficient protocol for the detection of chromosomal abnormalities in spontaneous miscarriages or foetal deaths. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009. doi: 10.1016/j.ejogrb.2009.07.023.
- [10] Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, et al. Human aneuploidy: incidence, origin and etiology. *Environ Mol Mutagen* 1996;28:167–75.
- [11] McFadden DE, Friedman JM. Chromosomes abnormalities in human beings. *Mutat Res* 1997;96:129–40.
- [12] Giorlandino C, Calugi G, Iaconianni L, Santero ML, Lippa A. Spermatozoa with chromosomal abnormalities may result in a higher rate of recurrent abortion. *Fertil Steril* 1998;70:576–7.
- [13] Lomax B, Tang S, Separovic E, et al. Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetics analysis of spontaneous abortions. *Am J Hum Genet* 2000;66(5):1516–21.
- [14] Jobanputra V, Sobrinho A, Kinney A, Kline J, Warburton D. Multiplex interphase FISH as a screen for common aneuploidies in spontaneous abortions. *Hum Reprod* 2002;17(5):1166–70.
- [15] Mann K, Donaghy C, Fox SP, Docherty Z, Ogilvie CM. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. *Eur J Hum Genet* 2004;12:907–15.
- [16] Hultén MA, Dhanjal S, Pertl B. Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction* 2003;126:279–97.
- [17] Schouten JP, McGunn CJ, Waaijer R, Zwijsenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30(12):e57.
- [18] Gerdts T, Kirchhoff M, Lind AM, Vestergaard Larsen G, Kjaergaard S. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in prenatal diagnosis—experience of a large series of rapid testing for aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn* 2008;28(12):1119–25.
- [19] Carp H, Toder V, Aviram A, Daniely M, Mashiach S, Barkai G. Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2001;75:678–82.
- [20] Diego-Alvarez D, de Alba AR, Cardero-Merilo R, et al. MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages. *Prenat Diagn* 2007;27:765–71.
- [21] Bruno DL, Burgess T, Ren H, et al. High-throughput analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using an MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for polyploidy. *Am J Med Genet* 2006;140A:2786–93.
- [22] Menasha J, Levy B, Hirschhorn K, Kardon NB. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from a 12-year study. *Genet Med* 2005;7(4):251–63.
- [23] Bettio D, Venci A, Levi Setti P. Chromosomal abnormalities in miscarriages after different assisted reproduction procedures. *Placenta* 2008;29:126–8.
- [24] Mc Donald HM, Chambers HM. Intrauterine infection and spontaneous midgestation abortion: is the spectrum of microorganisms similar to that in preterm labor? *Infect Dis Obstet Gynecol* 2000;8:220–7.
- [25] Bell K, Van Deerin P, Haddad B, Feinberg R. Cytogenetic diagnosis of “normal 46,XX” karyotypes in spontaneous abortions frequently may be misleading. *Fertil Steril* 1999;71:334–41.
- [26] Beever CL, Stephenson MD, Peñaherrera MS, et al. Skewed X-chromosome inactivation is associated with trisomy in women ascertained on the basis of recurrent spontaneous abortion or chromosomally abnormal pregnancies. *Am J Hum Genet* 2003;72:399–403.
- [27] Morales C, Sánchez A, Bruguera J, et al. Cytogenetic study of spontaneous abortions using semi-direct analysis of chorionic villi samples detects the broadest spectrum of chromosome abnormalities. *Am J Med Genet* 2008;146A(1):66–70.
- [28] Rodgers CS, Creasy MR, Fitchett M, Maliszewska CT, Pratt NR, Waters J. Solid tissue culture for cytogenetics analysis: a collaborative survey for Association of Clinical Cytogeneticists. *J Clin Pathol* 1996;49:638–41.

Please cite this article in press as: Carvalho B, et al. Aneuploidies detection in miscarriages and fetal deaths using multiplex ligation-dependent probe amplification: an alternative for speeding up results? *Eur J Obstet Gynecol* (2010), doi:10.1016/j.ejogrb.2010.06.022

ARTIGO III

**Application of Touch FISH in the study of mosaic tetraploidy
and maternal cell contamination in pregnancy losses.**

***J Assist Reprod Genet*, 2010**

(doi: 10.1007/s 10815-010-9460-1)

Application of touch FISH in the study of mosaic tetraploidy and maternal cell contamination in pregnancy losses

Sofia Dória · Vera Lima · Berta Carvalho ·
Maria Lina Moreira · Mário Sousa · Alberto Barros ·
Filipa Carvalho

Received: 29 March 2010 / Accepted: 21 July 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract

Purpose Karyotype is a well established technique in the study of spontaneous miscarriages but is associated with selective overgrowth of maternal cells and other culture artefact (spp) such as tetraploidy, which could mask the true karyotype of the conceptus.

Methods 328 cases of pregnancy losses were studied by karyotype and Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification technique. Touch FISH performed in non-cultured cells was used to evaluate the ploidy complement and sex

discrepancies using centromeric probes for chromosomes X, Y and 18.

Results Touch FISH confirmed 13 cases of maternal contamination, identified a triploidy and a monosomy X. True tetraploidy was confirmed in 7/14 cases studied.

Conclusion Touch FISH protocol is extremely accurate in the distinction of genuine mosaicism from tissue culture artifacts namely in cases with suspicion of tetraploidy and can be used to confirm maternal cell contamination in cases with sex discrepancy between karyotype and MLPA.

Capsule Touch FISH as an effective approach for the study of pregnancy losses with maternal cell contamination or with mosaic tetraploid cells present in the karyotype.

S. Dória (✉) · V. Lima · B. Carvalho · M. L. Moreira ·
A. Barros · F. Carvalho
Department of Genetics, Faculty of Medicine, University of Porto,
Alameda Prof. Hernâni Monteiro,
4200-319 Porto, Portugal
e-mail: sdoria@med.up.pt

V. Lima
e-mail: veralima@med.up.pt

B. Carvalho
e-mail: bertalc@med.up.pt

M. L. Moreira
e-mail: mmoreira@med.up.pt

A. Barros
e-mail: abarros@med.up.pt

F. Carvalho
e-mail: filipac@med.up.pt

M. Sousa
UMIB, Department of Microscopy, Laboratory of Cell Biology,
Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar,
University of Porto,
Porto, Portugal
e-mail: msousa@icbas.up.pt

Keywords Touch FISH · Spontaneous miscarriages · Foetal death · Tetraploidy · Maternal contamination · Mosaicism

Introduction

Approximately 15% of all clinically recognizable pregnancies are genetically abnormal ending in miscarriage and about half of these are attributable to detectable chromosome abnormalities [1–4]. The most common abnormality is trisomy (namely of the chromosomes 16, 15, 22, 21, 13 and 18). Sex chromosome monosomy (45,X), polyploidy (more frequent triploidy) or mosaicism (presence of more than one different chromosomal complement in the same individual) account for the majority of the remaining chromosome abnormalities found [1, 2, 5, 6]. The methodology of cell culture and analysis of chromosomes is a well established procedure but this approach could be associated with selective overgrowth of maternally derived cells that could mask the true karyotype of the conceptus [3, 4]. In fact, most clinical laboratories report an excess of normal female over normal male karyotypes and a number of studies have confirmed that maternal cell overgrowth is not uncommon [5, 6].

The presence of mosaic tetraploid cells, characterized by four complete sets of chromosomes ($4n=92$) in cultures from amniotic fluid or from pregnancies losses is frequently associated with culture artifacts. Although about 1,3% of first trimester abortions cases are true tetraploids, distinction between culture artifact and true mosaicism should be performed [1, 7].

Interphase Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) is an efficient approach to screen for maternal cell contamination, at least in male foetus cases [8]. In a previous study, our group used a modified interphase FISH (which was designated by Touch-FISH) in the study of miscarriages or foetal deaths with no karyotype due to culture failure [1]. This technique uses samples from frozen tissues touched on a slide and allows the study of ploidy changes and identification of the Y chromosome in male cases with maternal contamination.

The importance of karyotyping the aborted material is consensual in the literature. In cases with culture failure other techniques (that are not culture depend), such as Comparative Genomic Hybridization (CGH) or Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) for subtelomeric regions could be used to overcome this problem [1, 9–12]. Nevertheless, polyploidy changes (that could explained about 10% of all spontaneous miscarriages) are not detected by these two techniques, and an additional technique such as interphase FISH should be performed [1, 11].

The aim of the present study was to investigate mosaic tetraploid cells observed in the karyotype of pregnancy losses samples, using Touch-FISH, an interphase FISH technique that allows the study of noncultured cells and the distinction of true mosaicism from culture artifacts. Additionally, Touch FISH was also applied in cases with suspicion of maternal contamination, which means a discordant result between a female karyotype and a male profile achieved by MLPA technique.

Material and methods

Tissue preparation

Ovular fragments (5–10 weeks of gestation), foetal or placental specimens (11–39 weeks of gestation) from 328 women were successfully cultivated to perform karyotype and analyzed by MLPA technique. Spontaneous miscarriages or an intrauterine fetal death specimens were collected in a sterile tube containing RPMI 1640 medium (PAA, Haidmannweg, Austria) supplemented with antibiotics. After gross examination and clearing of blood clots and mucus, each tissue sample was divided in fragments, one part was cultured for cytogenetic

analysis and the other was frozen and stored at -80°C . Informed consent was obtained from all participants (Genetic Testing and Personal Data Protection National Laws).

Cytogenetic analysis

Tissues were sliced into small pieces and digested with collagenase type I (Gibco, Grand Island, New York), during 3–4 h at 37°C . Cells were cultured in AmnioMax™ C100 Basal medium with Supplement (Gibco). Preparation of chromosome slides and G-banding using Leishman stain were performed according to standard methods [13].

Touch fluorescence *in situ* hybridization (touch FISH)

Protocol for Touch FISH was previously described [1]. Briefly, small frozen pieces of tissue ($2\text{--}3\text{ mm}^3$) were cut and gently touched onto a poly-L-lysine coated slide (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany) and then fixed in methanol and fresh fixative (3:1 methanol/acetic acid). Subsequently, slides were incubated in a series of solutions: 2xSSC (pH 7.0), formaldehyde solution (2 ml 37% formaldehyde, 0,36 g Mg_2Cl_2 and 78 ml 1xPBS), pepsin solution (112,5 mg Pepsin and 75 ml 0,01 N HCl) and rinsed in 1xPBS. Dehydration was performed in ethanol series (70%, 96% and 100%).

Alpha satellite probes for the centromeric regions (CEP probes for chromosomes X, Y and 18) or a locus specific probe (LSI for chromosome 21) were prepared according to manufacturer instructions (Abbott, Wiesbaden, Germany). Slides were counterstained with DAPI/Vectashield (Vector Laboratories, California, USA) and analyzed in a epifluorescence microscope (Nikon; Tokyo, Japan) equipped with a charge-coupled device camera (Sony, Tokyo, Japan) and appropriate software (Applied Imaging International, Sunderland, UK).

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

DNA extraction was performed using the ReadyAmp kit Genomic DNA Purification System (Promega Corporation, Madison, USA). The probe mix included in the MLPA kit (SALSA P095, MRC Holland) contains eight probes for human chromosome X, four for Y target sequences, as well as 8 probes specific for each of chromosome 13, 18 and 21 sequences. After ligation and PCR (Polymerase Chain Reaction), the multiplex-fluorescent products were denatured and capillary electrophoresis was carried out in an ABI PRISM 310. Analysis of results and calculations of peak areas of the target sequences (chromosomes 13, 18, 21, X, Y) was performed using GeneScan Software (Applied Biosystems).

Results

A successful karyotype was performed in 328 samples from spontaneous miscarriages or foetal deaths, 87 of which were abnormal and distributed as follows: 49/87 cases showed trisomies, 14/87 cases showed full or mosaic tetraploidy, 11/87 cases showed triploidy, 7/87 showed monosomy X and 6/87 showed structural abnormalities. An apparent normal karyotype was found in the remaining, 181 female karyotypes and 60 male karyotypes. MLPA was performed in all 328 cases and found 24 abnormal profiles, 216 female and 88 male normal profiles. In 12 cases sex discrepancy between karyotype and MLPA profile was observed. Touch FISH was performed in all these 12 cases to evaluate the presence of foetal cells (male cells) in the original non-cultured tissue (Table 1). Additionally, one case with a slightly decrease of X chromosome ratio in the MLPA profile, was also investigated by Touch FISH (Table 1).

Touch FISH approach confirmed all suspected cases of maternal cell contamination due to sex discrepancy between karyotype and MLPA, including one case with trisomy 21 (Table 1, Fig. 1a). A MLPA male profile (Table 1, case 71752) was found in a case with a female chromosomal balanced rearrangement (Robertsonian translocation). Touch FISH confirmed the presence of cells with Y chromosome so the balanced Robertsonian translocation was interpreted as being mother's karyotype (maternal contamination). Additionally, Touch FISH allow the detection of a triploid case (Table 1, case 73931; Fig. 1b) not detected either by the karyotype (only maternal 46,

XX cells were present) or by MLPA approach. In the case with a MLPA result showing a slight decrease of X chromosome (Table 1, case 75616), Touch FISH identified cells with monosomy of the chromosome X and cells with normal XX complement which could correspond to maternal contamination.

From the 328 cases karyotyped, 14 showed the presence of tetraploid cells in different slides performed from distinct cultures. These cases were selected to Touch FISH analysis (Table 2).

Confirmation of a true tetraploidy was achieved in half of the cases (7/14) studied by Touch FISH (Table 2, Fig. 1c). Cases without mosaicism, in which all cells observed were tetraploid, were confirmed as true tetraploid cases (Table 2).

Discussion

Among the many complicated causes of early pregnancy losses, chromosomal abnormalities are considered the most common etiological factor [11, 14–16]. Finding an abnormal karyotype in the products of conceptions provides an obvious explanation for the miscarriage, which avoids unnecessary testings and treatments namely in recurrent cases [17]. Nevertheless, the value of the karyotype is limited in cases of maternal cell contamination or culture artifacts and genetic counseling is obviously compromised.

The aim of the present study was to determine the value of the interphase FISH technique using touch preparations (Touch FISH) from ovular fragments, frozen foetus or placental tissues as an efficient approach to be used in cases

Table 1 Cases of pregnancy losses with suspicion of maternal cell contamination

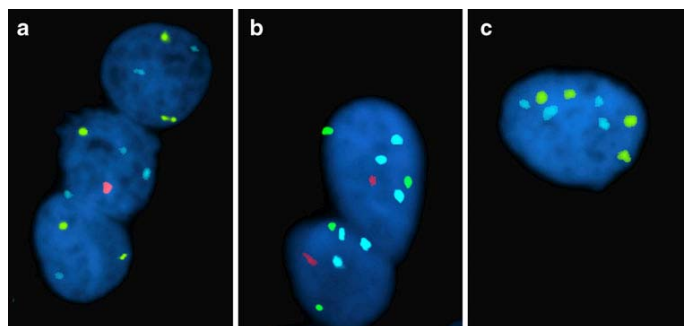
Cases	Trimester	Type of tissue	Karyotype	MLPA	Touch FISH	Final Result
71752	1T	OF	45,XX,rob(14;15)	Normal XY	XY,18,18/XX,18,18	Normal male
71912	1T	OF	46,XX	Normal XY	XY,18,18/XX,18,18	Normal male
73060	2T	PL	46,XX	Normal XY	XY,18,18/XX,18,18	Normal male
73931	1T	OF	46,XX	Normal XY	XXY,18,18,18/XX,18,18	Male with triploidy
74103	1T	OF	46,XX	Trisomy 21, XY	XY,21,21,21/XX,21,21	Male with trisomy 21
75082	3T	PL	46,XX	Normal XY	XY,18,18/XX,18,18	Normal male
75530	1T	OF	46,XX	Normal XY	XY,18,18/XX,18,18	Normal male
75616	1T	OF	46,XX	Normal XX ^a	X,18,18/XX,18,18	Female with monosomy X
75734	1T	OF	46,XX	Normal XY	XY,18,18/XX,18,18	Normal male
75862	1T	OF	46,XX	Normal XY	XY,18,18/XX,18,18	Normal male
76762	1T	OF	46,XX	Normal XY	XY,18,18/XX,18,18	Normal male
82789	1T	OF	46,XX	Normal XY	XY,18,18/XX,18,18	Normal male
82860	1T	OF	46,XX	Normal XY	XY,18,18/XX,18,18	Normal male

1T, first trimester; 2T, second trimester; 3T, third trimester; OF, Ovular Fragments; PL, Placenta

^a in this case, a slightly decrease of X

chromosome ratio was observed, but with no criteria to be validate as monosomy X

Fig. 1 Touch FISH. Centromeric probes to chromosomes X (green), Y (red) and 18 (blue). **a** Case 82860 - cells with an XX complement confirm maternal cell contamination in a male fetus; **b** Case 73931 - triploidy XXY; **c** Case 83524 - tetraploidy XXXX



with suspicion of maternal contamination or with high grade mosaic tetraploid cells present in the karyotype. Touch FISH has the advantage of analyzing cells directly from the tissue sample without cells being exposed to culture, overcoming the problem of overgrowth of maternal cells or culture artifacts.

We found only 87 (27%) chromosomal abnormal cases in 328 samples from pregnancy losses. The majority of literature refers that at least 50% of all spontaneous abortions have abnormal chromosomes, but this is particularly true for early cases, namely before 12 weeks [17–19]. The lower incidence in our series could be explained by an excess of normal female karyotypes due to maternal contamination. In fact, other authors concluded that as many as 30–40% of the 46,XX karyotypes from cultured samples may represent mater-

nally derived cells [20, 21]. Other reason could be the inclusion of samples from all three trimesters of pregnancy that will lower the probability of detection of a chromosomal abnormality.

Maternal cell overgrowth was confirmed in all 13 cases studied by Touch FISH with suspicion of maternal cell contamination, showing the presence of XY cells (male fetus) mixed with XX cells (maternal cells). Additionally, was able to detect one triploid case and a case with monosomy X. This case was not detected by MLPA due to an excess of maternal cells present in the sample. The SALSA MLPA P095 kit can be used easily to detect aberrant copy numbers of the human chromosomes 13, 18, 21, X and Y and enables the identification of maternal contamination in male cases detecting the Y chromosome. Notwithstanding MLPA, itself, could

Table 2 Cases of pregnancy losses with tetraploid in the karyotype

Cases	Trimester	Type of tissue	Karyotype	MLPA	Touch FISH	Final Result
71271	1T	OF	92,XXYY/46,XY	Normal XY	XY,18,18	Normal male
71675	3T	PL	92,XXXX/46,XX	Normal XX	XX,18,18	Normal female
71754	1T	OF	92,XXXX/46,XX	Normal XX	XX,18,18	Normal female
72938	1T	OF	92,XXXX	Normal XX	XXXX,18,18,18,18	Female with tetraploidy
72247	3T	PL	92,XXXX/46,XX	Normal XX	XX,18,18	Normal female
72268	1T	OF	92,XXXX/46,XX	Normal XX	XXXX,18,18,18,18	Female with tetraploidy
73398	1T	OF	92,XXXX	Normal XX	XXXX,18,18,18,18	Female with tetraploidy
74077	1T	OF	92,XXXX/46,XX	Normal XX	XX,18,18	Normal female
76049	1T	OF	92,XXXX	Normal XX	XXXX,18,18,18,18	Female with tetraploidy
76904	1T	OF	92,XXXX/46,XX	Normal XX	XX,18,18	Normal female
77178	1T	OF	92,XXXX	Normal XX	XXXX,18,18,18,18	Female with tetraploidy
77613	1T	OF	92,XXXX/46,XX	Normal XX	XX,18,18	Normal female
82977	1T	OF	92,XXXX/46,XX	Normal XX	XXXX,18,18,18,18	Female with tetraploidy
83524	1T	OF	92,XXXX/46,XX	Normal XX	XXXX,18,18,18,18	Female with tetraploidy

1T, first trimester; 2T, second trimester; 3T, third trimester; OF, Ovular Fragments; PL, placenta

detect misclassification of female normal karyotype (in male samples) due to maternal cell overgrowth in the culture. It is important to stress that Touch FISH, even though being a less cost-effective technique than MLPA, is highly efficient in detecting low-grade mosaicism. This allows identification of abnormalities not always detected by MLPA analysis due to a high grade of maternal cells present in the sample, justifying the result obtained in the case of monosomy X (case 75616, Table 1). Additionally, Touch FISH could detect polyploidies (triploidies and tetraploidies) which is an added value of this technique.

Maternal cell contamination was not the only drawback observed. In fact, other authors described high levels of tetraploidy or full tetraploidy in long-term cultures from spontaneous abortions [3, 5, 22]. In chorionic villi or amniotic cells the presence of tetraploid cells is generally considered as a false positive result due to confined placental mosaicism or placental culture artifacts [23, 24]. Although, not common, true tetraploidy in foetuses with multiple congenital defects were found [23, 25]. About 1,3% of first trimester miscarriages are true tetraploid which means that the presence of tetraploid cells should be carefully analyzed and confirmed. From the 14 cases with a high proportion of tetraploid cells, we were able to demonstrate it as a true condition in 7 cases. These tetraploids cells were seen in different flasks from independent cultures. We think that Touch FISH approach performed directly in foetal or placental tissue with no interference of an *in vitro* culture could be an efficient assay to prove the existence of a true tetraploidy.

In conclusion, Touch FISH protocol is an efficient approach to be used as a tool to confirm maternal cell contamination in cases with sex discrepancy between karyotype and MLPA, allowing also the identification of new cytogenetic abnormalities that could be present and also being extremely accurate in the distinction of genuine mosaicism from tissue culture artifacts.

References

- Doria S, Carvalho F, Ramalho C, Lima V, Francisco T, Machado AP, et al. An efficient protocol for the detection of chromosomal abnormalities in spontaneous miscarriages or foetal deaths. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009;147:144–50.
- Goddijn M, Leschot NJ. Genetic aspects of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2000;14:855–65.
- Karagöz MY, Nas T, Konac E, Ince D, Pala E, Menevse S. Is cytogenetic diagnosis of 46, XX karyotype spontaneous abortion specimens erroneous? Fluorescence in situ hybridization as a confirmatory technique. *J Obstet Gynaecol Res.* 2005;31:508–13.
- van den Berg C, Van Opstal D, Polak-Knook J, Galjaard RJ. (Potential) false-negative diagnoses in chorionic villi and a review of the literature. *Prenat Diagn.* 2006;26:401–8.
- Bell KA, Van Deerlin PG, Haddad BR, Feinberg RF. Cytogenetic diagnosis of “normal 46, XX” karyotypes in spontaneous abortions frequently may be misleading. *Fertil Steril.* 1999;71:334–41.
- Jobanputra V, Sobrino A, Kinney A, Kline J, Warburton D. Multiplex interphase FISH as a screen for common aneuploidies in spontaneous abortions. *Hum Reprod.* 2002;17:1166–70.
- Boue J, Bou A, Lazar P. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology.* 1975;12:11–26.
- Vorsanova SG, Kolotii AD, Iourov IV, Monakhov VV, Kirillova EA, Soloviev IV, et al. Evidence for high frequency of chromosomal mosaicism in spontaneous abortions revealed by interphase FISH analysis. *J Histochem Cytochem.* 2005;53:375–80.
- Bruno DL, Burgess T, Ren H, Nouri S, Pertile MD, Francis DI, et al. High-throughput analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using an MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for polyploidy. *Am J Med Genet A.* 2006;140:2786–93.
- Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet.* 2001;38:740–4.
- Lomax B, Tang S, Separovic E, Phillips D, Hillard E, Thomson T, et al. Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions. *Am J Hum Genet.* 2000;66:1516–21.
- Diego-Alvarez D, Rodriguez de Alba M, Cardero-Merlo R, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C, et al. MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages. *Prenat Diagn.* 2007;27:765–71.
- Gustashaw K. Chromosome stains. In: *The ACT cytogenetics laboratory manual*, 2nd edition. New York, 1991.
- Eiben B, Bartels I, Bahrporsch S, Borgmann S, Gatz G, Gellert G, et al. Cytogenetics analysis of 750 spontaneous abortions with the direct preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet.* 1990;47:656–63.
- Daniely M, Aviram-Goldring A, Barkai G, Goldman B. Detection of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization. *Hum Reprod.* 1998;13:805–9.
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet.* 1980;44:151–78.
- Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet.* 2006;368:601–11.
- Morales C, Sanchez A, Bruguera J, Margarit E, Borrell A, Borbio V, et al. Cytogenetic study of spontaneous abortions using semi-direct analysis of chorionic villi samples detects the broadest spectrum of chromosome abnormalities. *Am J Med Genet A.* 2008;146A:66–70.
- Azmanov DN, Milachich TV, Zaharieva BM, Michailova GI, Dimitrova VG, Karagiozova ZH, et al. Profile of chromosomal aberrations in different gestational age spontaneous abortions detected by comparative genomic hybridization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007;131:127–31.
- Bartels I, Hansmann I, Eiben B. Excess of females in chromosomally normal spontaneous abortuses. *Am J Med Genet.* 1990;35:297–8.
- Jarrett KL, Michaelis RC, Phelan MC, Vincent VA, Best RG. Microsatellite analysis reveals a high incidence of maternal cell contamination in 46, XX products of conception consisting of villi or a combination of villi and membranous material. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;185:198–203.

22. Lathi RB, Milki AA. Tissue sampling technique affects accuracy of karyotype from missed abortions. *J Assist Reprod Genet.* 2002;19:536–8.
23. Schluth C, Doray B, Girard-Lemaire F, Favre R, Flori J, Gasser B, et al. Prenatal diagnosis of a true fetal tetraploidy in direct and cultured chorionic villi. *Genet Couns.* 2004;15:429–36.
24. Montanari D, Haefliger C, Mollica ME, Banares V, Zelaya G. Prenatal diagnosis of a diploid-tetraploid fetus. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2000;79:1026.
25. Sharma A, Paliwal P, Dadhwal V, Sharma Y, Deka D. Rare finding of 2n/4n mixoploidy in mother and fetus with severe immune hydrops. *Cytogenet Genome Res.* 2009;124:90–3.

ARTIGO IV

Gene expression pattern of *IGF2*, *PHLDA2*, *PEG10* and *CDKN1C* imprinted genes in spontaneous miscarriages or foetal deaths. *Epigenetics*. 2010; Jul 21; 5(5).

Gene expression pattern of *IGF2*, *PHLDA2*, *PEG10* and *CDKN1C* imprinted genes in spontaneous miscarriages or foetal deaths

Sofia Dória,^{1,*} Mário Sousa,^{1,4} Susana Fernandes,¹ Carla Ramalho,² Otilia Brandão,³ Alexandra Matias,² Alberto Barros¹ and Filipa Carvalho¹

¹Department of Genetics; Faculty of Medicine; University of Porto; Porto, Portugal; ²Department of Obstetrics and Gynaecology—Hospital de São João EPE; Faculty of Medicine; University of Porto; Porto, Portugal; ³Department of Pathology; Hospital São João EPE; Porto, Portugal; ⁴Laboratory of Cell Biology; Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar; UIMB; University of Porto; Porto, Portugal

Key words: imprinted genes, *IGF2*, *PHLDA2*, *PEG10*, *CDKN1C*, spontaneous miscarriages, imprinting

Abbreviations: IUGF, intrauterine growth factors; qRT-PCR, quantitative real time-polymerase chain reaction; GOI, gene of interest; REF, reference gene; GEOMEAN, geometric mean; SM, spontaneous miscarriages; FD, foetal death

Genomic imprinting is defined as an epigenetic modification that leads to parent-of-origin specific monoallelic expression. Some current research on the foetal control growth has been focused on the study of genes that display imprinted expression in utero. Four imprinted genes, two paternally expressed (*IGF2* and *PEG10*) and two maternally expressed (*PHLDA2* and *CDKN1C*) are well known to play a role in foetal growth and placental development.

Pregnancy loss in the general reproductive population is a very common occurrence and other genetic causes beyond chromosomal abnormalities could be involved in spontaneous miscarriages or foetal deaths, such as alteration of expression in imprinted genes particularly those related to foetal or placental growth.

Quantitative Real Time PCR was performed to evaluate gene expressions patterns of the four mentioned genes in spontaneous miscarriages or foetal deaths from 38 women. Expression levels of *PHLDA2* gene were upregulated in the first trimester pregnancy cases and all four imprinted genes studied were upregulated in the second trimester of pregnancy cases comparing with controls. In third trimester *PEG10* was downregulated in foetal samples group.

This is the first study presenting data from human imprinted genes expression in spontaneous miscarriages or foetal deaths cases from the three trimesters of pregnancy.

Introduction

Genomic imprinting is defined as an epigenetic modification that leads to parent-of-origin specific monoallelic expression. It is established early in the germ line in each generation and inherited throughout the somatic cell division. The nature of genomic imprinting is that both parental chromosomes are present within the same diploid, somatic nucleus, and yet the transcriptional machinery of the cell is able to identify which chromosome should be expressed and which should be repressed. This silencing process occurs by DNA methylation and/or histone modification.¹⁻³

Although imprinted genes comprise a small subset of the human genome, they have been shown to be essential to foetal, placental and behavioural development.⁴⁻⁷ Disruption of allele-specific expression of imprinted genes is associated with several human genetic diseases, progression of certain cancers and a number of neurological disorders.⁸⁻¹² In the two most well known imprinted gene public databases (<http://www.geneimprint.com> or <http://igc.otago.ac.nz>) up to 63 human imprinted genes are

listed, but the exact number of human imprinted genes is difficult to ascertain because monoallelic expression of these genes may occur only at specific stage of development, specific tissue type or even in one specific isoform.^{3,13,14}

Pregnancy loss in the general reproductive population is a very common event.¹⁵ Approximately 30% to 50% of all conceptions and at least 10% of clinically recognized pregnancies (≥6 weeks of gestation) fail to result in a live birth.¹⁵⁻¹⁷ Genetic defects of the zygote, such as chromosome abnormalities, are the most frequent causes of abnormal embryonic development and spontaneous miscarriages (SM).¹⁸⁻²⁰ However, genetic factors, other than chromosomal abnormalities could also be involved. Imprinted genes play important roles in early human development, acting as growth factors such as *IGF2* (Insulin-like Growth Factor 2; 11p15.5) or as gene expression regulators that control foetal growth and placental development.^{1,21-25} Other imprinted genes such as *PHLDA2* (Pleckstrin Homology-like Domain, family A, member 2; 11p15.5) and *CDKN1C* (Cyclin-Dependent Kinase inhibitor; 11p15.5) are known to be involved in intrauterine

*Correspondence to: Sofia Dória; Email: sdoria@med.up.pt

Submitted: 03/05/10; Accepted: 04/21/10

Previously published online: www.landesbioscience.com/journals/epigenetics/article/12118

growth restriction (IUGR)²⁶⁻²⁹ and *PEG10* (Paternally Expressed Gene 10; 7q21.3) was associated with early embryonic lethality in mice.³⁰ Imprinted genes that are paternally expressed (maternally imprinted) are supposed to promote growth either in utero or in the perinatal period, while maternally expressed (paternally imprinted) genes may act as growth suppressors limiting maternal resources to foetus.^{3,31}

Although imprinted genes have a critical role in early human development and regulation of foetal growth, there are only few studies, the majority in mice, that provide a comprehensive analysis of the expression profiles of imprinted genes during gestation, mainly in SM.^{30,32,33} In this study, Real-Time RT-PCR was used to evaluate the expression of four human imprinted genes, two paternally expressed (*IGF2* and *PEG10*) and two maternally expressed (*PHLDA2* and *CDKN1C*) in cases of SM or foetal death (FD) from the three trimesters of pregnancy.

Results

Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) was performed for 4 imprinted genes (*IGF2*, *PHLDA2*, *PEG10* and *CDKN1C*) in 54 foetal or placental samples (whenever possible both specimens) from 38 women patients. The cases were grouped according to gestational age and 18 controls were paired with cases according to similar gestational ages (Table 1). Clinical and pathologic information of the cases and controls is also presented in Table 1.

Analysis of the qRT-PCR results was done by using REST 2009 software. The results are summarized in Table 2. For reference gene normalization, two housekeeping genes were used: *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase) and *ACTB* (Actina Beta). Samples expressions ratios were calculated with REST software using the following formula:

Relative Expression = Concentration of Gene of interest + Geometric mean (concentration of reference gene 1, concentration of reference gene 2,...)

Using this software, we estimated the up or downregulation for each imprinted gene expression, comparing cases with controls for the three trimesters of pregnancy.

In the first trimester, we found that the *PHLDA2* gene was the only one presenting upregulation. For the other three genes no significant differences between cases and controls were found (Table 2; Fig. 1A).

In the second trimester cases, the four imprinted genes studied were upregulated for both foetal and placental samples (Table 2; Fig. 1B and C). Additionally, it could also be noted that *PHLDA2* was the most upregulated gene. Comparing foetal and placental samples, relative expression of *PHLDA2* gene was higher in foetal samples (mean factor of 27,729 versus 16,305), although with no statistical significance ($p = 0.1095$). For the other three genes no statistical differences were found comparing relative expression values from foetal and placental samples.

In the third trimester, no differences were found comparing cases and controls except for *PEG10* gene that presented downregulation of relative expression in cases of foetal samples (Table 2;

Fig. 1D). Comparing foetal with placental samples statistical differences were found only for *PHLDA2* ($p = 0.0431$).

Analysing only cases with IUGR cases (Table 1) for second and third trimester gene expression of *PHLDA2* was upregulated only in foetal samples. No statistical significant differences were found for the other three genes, either in foetal or placental samples (data not shown).

Discussion

In humans, pregnancy losses are extremely common and not completely understood. Approximately 25% of reproductive-aged women attempting pregnancy have spontaneous miscarriages, and at least 10% of all clinical pregnancies are lost.^{16,17,34} The phenomenon of genomic imprinting has been demonstrated to play a key role in foetal development and placentation.^{35,36} Embryogenesis and placentation are particularly prone to perturbations in gene expression because these processes depend on a complex cascade of events. Any disruption to the well-orchestrated expression of these regulatory factors may lead to placental disorders, causing undesirable phenotypes or even early deaths in humans.³⁶ Imprinting gene expression can be found in the placenta, the foetus, or both, independently of the parental origin of the expressed allele, and might be widespread or specific to certain cell types.³⁷ Imprinted genes function are generally essential for the adequate development and function of the placenta and foetal growth.³⁶ They might play a key role in diseases affecting the placenta, such as hydatiform mole, placental mesenchymal dysplasia and in foetal overgrowth or intrauterine growth restriction (IUGR). Taking this into account one can consider that any perturbation in imprinted gene expression could be a reasonable explanation for a foetal loss.

Several studies were performed to evaluate the expression of imprinted genes in human placenta.^{3,25,27-29,37-42} However, few have studied the association between disruption or expression alteration of human imprinted genes and spontaneous pregnancies losses.^{30,33,43} A previous study from our group reinforces the data from literature and demonstrates that chromosomal abnormalities (mainly aneuploidies) are the most frequent cause of pregnancy loss in the first trimester (with a considerable proportion even in the second trimester).^{15-17,20} In addition, other etiologies have been described, including single gene defects (i.e., thrombophilic mutations), endocrinal and immunological factors, anatomical abnormalities, environments exposures and infections.^{16,17} Notwithstanding, a large proportion of cases remains unexplained.

To evaluate disruption/alterations of the imprinting status in SM or FD, mRNA expression levels of four imprinted genes, two paternally expressed *IGF2* and *PEG10* and two maternally expressed *PHLDA2* and *CDKN1C* were studied. Additionally, and because expression profile of imprinted genes could vary along gestation, cases were grouped according to the gestational age.

Maternal expressed genes tend to restrict growth, whereas paternally expressed genes enhance growth. According to the "parental conflict" theory, paternal genome acts to silence genes that limit growth thus maximizing extraction of maternal resources for

Table 1. Cases of interest and paired controls according to gestational age and selected for the study of the imprinted gene expression in the three trimesters of pregnancy

Cases N° (1T)	TT	GA (w)	CF	Controls N°	TT	GA (w)	CF
72297	OF	6	IC	81598	OF	6	VTOP
72404	OF	6	IC	81598	OF	6	VTOP
75059	OF	7	IC	81598	OF	6	VTOP
68006	OF	8	IC	76305	OF	9	VTOP
68271	OF	8	IC	76305	OF	9	VTOP
72060	OF	9	IC	76305	OF	9	VTOP
74665	OF	9	IC	76305	OF	9	VTOP
74971	OF	9	IC	76305	OF	9	VTOP
78293	OF	9	IC	76305	OF	9	VTOP
69582	OF	9	IC	76305	OF	9	VTOP
70661	OF	10	IC	76305	OF	9	VTOP
71984	OF	11	IC	70265	OF	12	infection
78089	OF	12	IC	70265	OF	12	infection
Cases N° (2T)							
73849	PI	15	IC	75559	PI	14	infection
72918/72919	F/PI	15	IC	75558/75559	F/PI	14	infection
75112	PI	15	IC	75559	PI	14	infection
77270/77271	F/PI	15	IC	75558/75559	F/PI	14	infection
70709/70711	F/PI	16	IC	75558/75559	F/PI	14	infection
75614	PI	16	IUGR	75559	PI	14	infection
75730/75729	F/PI	17	IC	74053/74066	F/PI	17	infection
77989	F	17	IUGR	74053	F	17	infection
78091/78093	F/PI	17	IUGR	74053/74066	F/PI	17	infection
74239/74240	F/PI	18	IC	74053/67613	F/PI	17/18	infection
74741/74740	F/PI	18	IC	74053/67613	F/PI	17/18	infection
77176/77175	F/PI	18	IC	74053/67613	F/PI	17/18	infection
72983/72984	F/PI	19	IC	78521/67613	F/PI	20/18	infection
68977/68979	F/PI	24	IUGR	78521/67613	F/PI	20/18	infection
70091/70100	F/PI	24	FD	78521/67613	F/PI	20/18	infection
75228	PI	24	FD	67613	PI	18	infection
Cases N° (3T)							
71747	F	27	IUGR	74027	F	27	UCS
67277	F	28	IUGR	60809	F	28	infection
75603/75602	F/PI	29	IUGR	74027/74028	F/PI	27	UCS
74521/74522	F/PI	31	IUGR	66455/69106	F/PI	30/33	infection
68807/68808	F/PI	33	IUGR	66455/69106	F/PI	30/33	infection
71238/71240	F/PI	34	FD	69353/69106	F/PI	36/33	infection
75420/75419	F/PI	35	C	72247/72253	F/PI	37	PA
73967	F	36	C	69353	F	36	infection
72848	F	39	FD	71315	F	39	infection

1T, First trimester; 2T, Second trimester; 3T, Third trimester; TT, Type of tissue; GA, Gestational age; W, weeks; CF, Clinical findings; OF, Ovular fragments; F, Foetal tissue; PI, Placenta; IC, Idiopathic cause; IUGR, Intrauterine growth restriction; FD, Foetal Deaths; C, Cardiopathy; VTOP, Voluntary termination of pregnancy; PA, Placental abruption; UCS, Umbilical cord stenosis.

the benefit of the offspring. In contrast, the maternal genome limits nutrient provision acting to preserve such resources.^{35,44} Misregulation of imprinted genes expression caused by deletion and

inappropriate silencing or loss of imprinting has been implicated in several pathologies such as human genetic diseases associated to foetal and placental growth, cell proliferation, adult behaviour and

Table 2. Imprinted gene expression pattern in cases of spontaneous abortions or foetal deaths

	Gene	Expression	CI (95%)	P(H1)	Result
1T	IGF2	1.033	0.077–86.541	0.95	ND
	PHLDA2	33.613	0.146–756.154	<0.001	UP
	PEG10	3.794	0.029–404.299	0.079	ND
	CDKN1C	1.141	0.086–51.488	0.782	ND
2T-FS	IGF2	3.862	0.114–106.267	0.035	UP
	PHLDA2	27.729	0.158–2222.119	0.001	UP
	PEG10	4.529	0.392–98.392	0.006	UP
	CDKN1C	4.104	0.236–41.060	0.002	UP
2T-PS	IGF2	4.205	0.426–68.766	<0.001	UP
	PHLDA2	16.305	0.029–2974.416	0.002	UP
	PEG10	5.244	0.176–71.561	0.001	UP
	CDKN1C	3.699	0.130–364.750	0.037	UP
3T-FS	IGF2	0.714	0.028–53.360	0.622	ND
	PHLDA2	4.176	0.086–648.640	0.127	ND
	PEG10	0.15	0.003–14.572	0.028	DOWN
	CDKN1C	0.33	0.009–5.267	0.085	ND
3T-PS	IGF2	0.213	0.007–16.551	0.199	ND
	PHLDA2	0.258	0.012–39.695	0.243	ND
	PEG10	0.372	0.001–214.575	0.549	ND
	CDKN1C	0.985	0.011–14375.938	0.993	ND

1T, First trimester; 2T, Second trimester; 3T, Third trimester; FS, Foetal samples; PS, Placental samples; CI, Confidence interval; P(H1), Probability of alternate hypothesis that difference between sample and control groups is due only to chance; ND, Sample group is not different to control group; UP, Upregulated; DOWN, Downregulated.

cancer.^{12,45} The expression of imprinted genes may be tissue and stage specific with one of the parental alleles being differentially expressed only at a certain development stage or in certain cells. However, the monoallelic expression of an imprinted gene is not absolute. Thus, a potential role of genomic imprinting in the tissues differentiation is to determine the transcription rate of genes that influence growth through a fine balance between the expression of two parental alleles.¹²

The majority of current research has been focused on the study of expression/methylation of human imprinted genes using term placentas associated with IUGR.^{3,25,26,28} The most recent work in this field evaluates the methylation values of 6 imprinted genes in human miscarriages and stillbirths.⁴³ The authors found hypermethylation in 4% of SM cases and 18% in stillbirths cases. They also found that epigenetic defects were predominantly associated with unexplained pregnancy loss, particularly in the second half of pregnancy, despite they did not evaluate cases before 12 weeks of gestation. The results from our work also demonstrate that the most significant differences between cases and controls were in the second trimester of pregnancy.

All four genes studied *IGF2*, *PHLDA2*, *PEG10* and *CDKN1C* were upregulated in the second trimester cases. *PHLDA2* gene was also upregulated in the first trimester (Table 2). Data from literature has implicated *PHLDA2* as a potential marker of foetal

growth.^{25,28} It has also been suggested that this gene may have a more profound effect on the placenta at early gestational ages when the placenta is more active.²⁸ *PHLDA2* was upregulated by a mean factor of 33,613 in the first trimester cases and 20,645 in the second trimester. In comparison with the other three genes tested it was the most upregulated gene. This upregulation was even higher (mean factor of 62,149) if we considered only cases before 9 weeks (data not shown). The majority of literature shows *PHLDA2* as an upregulated gene in cases with IUGR or in small for gestational age placentas.^{3,25,26,28} As this is maternally expressed one would expect to be upregulated in cases of IUGR. On the other hand, *PEG10* and *IGF2* are paternally expressed and both were upregulated (however with much lower statistical significance) in the second trimester. This means that the “parental conflict” theory could not be applied to all imprinted human genes or to all situations namely in spontaneous miscarriages. It should also be noted that in comparison with mice, human pregnancies are normally singletons where the demand of maternal resources is less strenuous.^{3,13} This is consistent with previews reports, at least for *PEG10*.^{3,25} Ono et al. concluded that *PEG10* was essential for placenta formation and responsible for the early embryonic lethality seen during mouse development.³⁰ This could be also true for humans. Regarding *IGF2* expression there is an indication in the literature of downregulation in cases with IUGR placenta versus normal term placentas.²⁵ Our data do not contradict this result because the majority of the cases analysed in our study were from idiopathic spontaneous pregnancies losses not classified as IUGR cases which means that the upregulation or downregulation of a gene according to the “parental conflict” is not predictable.

The *CDKN1C* gene is closely linked to *PHLDA2* in chromosome 11p15.5, imprinted in the same way (maternal allele active; paternal allele repressed).²⁶ Like *PHLDA2*, but with lower statistical significance, *CDKN1C* mRNA level was increased on average in second trimester studied cases. When IUGR cases were analysed independently we found upregulation for *PHLDA2* gene in foetal samples. This is in accordance with previews reports, although we did not confirm this finding on placental samples.^{3,25,28} It is also important to stress that selection of cases included all cases with IUGR and discrimination of cases with slight IUGR from those with severe IUGR was not done. Adequate controls should be chosen from normal pregnancies (without any kind of complication) with a healthy newborn but this is not possible in humans. We have selected cases with proven infections, the most suitable cases to be used as our controls. However, in the literature a correlation between bacterial infection and hypermethylation of the promotor region of the *IGF2* gene was already found.⁴⁶ This means that the expression values for at least *IGF2* gene could be overestimated when compared with controls (infections) cases. Therefore, the study of methylation patterns of these genes and the enlargement of the number of cases studied is of major importance.

It is important to stress that, at least so far, it is not possible to exclude that the values of upregulation obtained in aborted foetus or placentas were not the cause but a consequence of aberrant

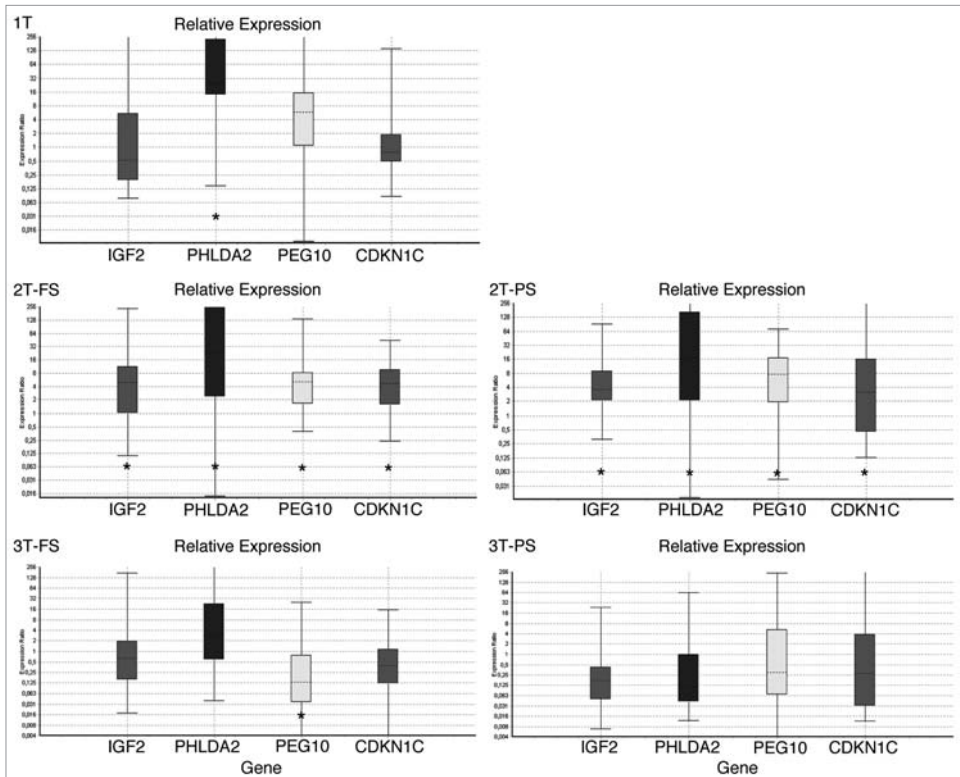


Figure 1. Box-plot of the normalized expression value for the imprinted genes *IGF2*, *PHLDA2*, *PEG10* and *CDKN1C* for the three trimesters of pregnancy; Boxes represent the interquartile range, or the middle 50% of observations. The dotted line represents the median gene expression. Whiskers represent the minimum and maximum observations. Asterisk denotes significant differences compared to control samples. First trimester of pregnancy (1T); foetal samples, Second trimester of pregnancy (2T); Third trimester of pregnancy (3T); Foetal samples (FS); Placental samples (PS).

development. So, if these observed changes in the gene expression are compensatory or adverse mechanisms underlying pathology should therefore be matter of further investigation.

Despite the increased interest on human imprinted genes and the recognition of the importance of the epigenetics apparatus in human diseases, little is known about imprinting gene regulation as well as their specific role in human placental growth, embryogenesis or both.

Because miscarriage in the general reproductive population is a very common occurrence and one of the major complications of pregnancy, it is very important to recognize the cause and ascertain the risk for a next pregnancy.

Although additional research will be required, this is the first study presenting data from human imprinted gene expression in cases of SM or FD from the three trimesters of pregnancy.

Material and Methods

Patients. A total of 54 samples (ovular fragments, foetal slice of skin from hill or thigh and placenta) from 38 women patients with a spontaneous miscarriage or foetal death were studied. Thirteen samples were obtained in the first trimester (5–12 weeks of gestation; ovular fragments), 16 from the second trimester (13–24 weeks of gestation; slice of calcaneum or skin and placenta; in 11/16 cases paired foetal/placental tissue was analysed) and 9 from third trimester of pregnancy (25–40 weeks of gestation; slice of calcaneum or skin and placenta, in 5/9 cases paired foetal/placental tissue was analysed). The samples were collected in RNA *later* and stored at -80°C until use. Only cases with normal karyotype or with a normal HR-CGH profile (High Resolution Comparative Genomic Hybridization) were used in the present

study. To exclude possible cases of maternal contamination in first trimester cases only samples with a normal male karyotype were included.

Eighteen control cases were used (placenta and foetal tissues) and paired with the cases of interest according to similar gestational age. Controls were selected from those with infections, proved maternal cause or voluntary termination of pregnancy (VTOP). Informed consent was obtained from all participants (Genetic Testing and Personal Data Protection National Laws).

RNA extraction and cDNA synthesis. Total RNA was extracted from samples using 1 ml of Tripure isolation reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) according to a standard protocol and quantified in a Biotech Photometer UV 1101 (WPA, Cambridge UK). For cDNA synthesis, 1 µg of total RNA was subjected to reverse transcription with random hexamers using the Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was eluted in 30 µl of Rnase-free water.

Quantitative RT-PCR. RNA expression levels of four imprinted genes (*IGF2*, *PHLDA2*, *PEG10* and *CDKN1C*) and two housekeeping genes (*GAPDH* and *ACTB*) was analysed by Real-Time PCR on a MasterCycler ep Realplex 2 System (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). TaqMan Gene Expression Assays (MGB probes, FAM dye-labeled; Applied Biosystems, Foster City, USA) were used for each target genes, *IGF2* (Hs01005963_m1), *PHLDA2* (Hs00169368_m1), *PEG10* (Hs01122880_m1) and *CDKN1C* (Hs00175938_m1), and endogenous controls *GAPDH* (Hs999999905_m1) and *ACTB* (Hs999999903_m1). PCR reactions were performed in a 25 µl volume containing

5 µl of cDNA, 12.5 µl of TaqMan universal PCR master mix System (Applied Biosystems), 6.25 µl of Rnase-free water and 1.25 µl of 20X TaqMan Gene Expression Assay Mix for each gene. PCR was performed in separated wells for each reaction and each sample was run in triplicate. For each gene, cases and controls samples were run in the same RT-PCR plate to minimize intra-plate variations. PCR parameters were as follows: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. In each plate negative controls were included and a standard curve for each gene analyzed constructed with a serial dilutions and run in duplicate.

Data analysis. Data was analysed using REST 2009 (Relative Expression Software Tool) that is a standalone software tool that estimates up and downregulation for gene expression studies (<http://www.qiagen.com/rest>). The purpose of this software is to determine whether there are significant difference between samples and controls, while taking in account issues of reaction efficiency and reference gene normalization. The hypothesis test P(H1) obtained represents the probability of the alternate hypothesis that the difference between the sample and control groups is due only to chance.⁴⁷ Real time PCR-negativity was defined by the absence of amplified product after 40 cycles and because REST software uses for calculations Ct values and reaction efficiency instead of relative expressions values, we assumed that the value of the last cycle of amplification (Ct = 40 cycles) should correspond to the value of absence of relative expression.

Wilcoxon Signed Rank Test was used for the statistical analysis (Statview for Windows) of the foetal and placental samples comparison, with the significance level set at p < 0.05.

References

- Tilghman SM. The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell* 1999; 96:185-93.
- Rugg-Gunn PJ, Ferguson-Smith AC, Pedersen RA. Status of genomic imprinting in human embryonic stem cells as revealed by a large cohort of independently derived and maintained lines. *Hum Mol Genet* 2007; 16:243-51.
- Diplas AI, Lambertini L, Lee MJ, Sperling R, Lee YL, Wetmur J, et al. Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas. *Epigenetics* 2009; 4:235-40.
- Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; 293:1089-93.
- Delaval K, Feil R. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14:188-95.
- Abu-Amero S, Monk D, Apostolidou S, Stanier P, Moore G. Imprinted genes and their role in human fetal growth. *Cytogenet Genome Res* 2006; 113:262-70.
- Coan PM, Burton GJ, Ferguson-Smith AC. Imprinted genes in the placenta—a review. *Placenta* 2005; 26:10-20.
- Maher ER, Reik W. Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *J Clin Invest* 2000; 105:247-52.
- Nicholls RD, Knepper JL. Genome organization, function and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2:53-75.
- Badcock C, Crespi B. Imbalanced genomic imprinting in brain development: an evolutionary basis for the aetiology of autism. *J Evol Biol* 2006; 19:1007-32.
- Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 2007; 8:253-62.
- Butler MG. Genomic imprinting disorders in humans: a mini-review. *J Assist Reprod Genet* 2009.
- Monk D, Arnaud P, Apostolidou S, Hills FA, Kelsey G, Stanier P, et al. Limited evolutionary conservation of imprinting in the human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:6623-8.
- Lambertini L, Diplas AI, Lee MJ, Sperling R, Chen J, Wetmur J. A sensitive functional assay reveals frequent loss of genomic imprinting in human placenta. *Epigenetics* 2008; 3:261-9.
- Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JE, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, et al. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1988; 319:189-94.
- Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet* 2006; 368:601-11.
- Stephenson M, Kutteh W. Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol* 2007; 50:132-45.
- Goddijn M, Leschot NJ. Genetic aspects of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14:855-65.
- Azmarov DN, Milachich TV, Zaharieva BM, Michailova GI, Dimitrova VG, Karagiozova ZH, et al. Profile of chromosomal aberrations in different gestational age spontaneous abortions detected by comparative genomic hybridization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007; 131:127-31.
- Doria S, Carvalho F, Ramalho C, Lima V, Francisco T, Machado AP, et al. An efficient protocol for the detection of chromosomal abnormalities in spontaneous miscarriages or foetal deaths. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009.
- Ferguson-Smith AC, Surani MA. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science* 2001; 293:1086-9.
- Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001; 2:21-32.
- Reik W, Davies K, Dean W, Kelsey G, Constanca M. Imprinted genes and the coordination of fetal and postnatal growth in mammals. *Novartis Found Symp* 2001; 237:19-31.
- Tycko B, Morison IM. Physiological functions of imprinted genes. *J Cell Physiol* 2002; 192:245-58.
- McMinn J, Wei M, Schupf N, Cusmai J, Johnson EB, Smith AC, et al. Unbalanced placental expression of imprinted genes in human intrauterine growth restriction. *Placenta* 2006; 27:540-9.
- Guo L, Choufani S, Ferreira J, Smith A, Chitayat D, Shuman C, et al. Altered gene expression and methylation of the human chromosome 11 imprinted region in small for gestational age (SGA) placentae. *Dev Biol* 2008; 320:79-91.
- Antonazzo P, Alvino G, Cozzi V, Grati FR, Tabano S, Sirchia S, et al. Placental IGF2 expression in normal and intrauterine growth restricted (IUGR) pregnancies. *Placenta* 2008; 29:99-101.
- Apostolidou S, Abu-Amero S, O'Donoghue K, Frost J, Olafsdottir O, Chavele KM, et al. Elevated placental expression of the imprinted *PHLDA2* gene is associated with low birth weight. *J Mol Med* 2007; 85:379-87.
- Salas M, John R, Saxena A, Barton S, Frank D, Fitzpatrick G, et al. Placental growth retardation due to loss of imprinting of *Phlda2*. *Mech Dev* 2004; 121:1199-210.
- Ono R, Nakamura K, Inoue K, Naruse M, Usami T, Wakisaka-Saito N, et al. Deletion of *Peg10*, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nat Genet* 2006; 38:101-6.

31. Constancia M, Kelsey G, Reik W. Resourceful imprinting. *Nature* 2004; 432:53-7.
32. Biniszkiewicz D, Gribnau J, Ramsahoye B, Gaudet F, Eggan K, Humphrys D, et al. Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting and embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 2002; 22:2124-35.
33. Ostojic S, Perez N, Volk M, Kapovic M, Peterlin B. Genetic predisposition to idiopathic recurrent spontaneous abortion: contribution of genetic variations in IGF-2 and H19 imprinted genes. *Am J Reprod Immunol* 2008; 60:111-7.
34. Warren JE, Silver RM. Genetics of pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol* 2008; 51:84-95.
35. Fowden AL, Sibley C, Reik W, Constancia M. Imprinted genes, placental development and fetal growth. *Horm Res* 2006; 65:50-8.
36. Bressan FF, De Bem TH, Perecin F, Lopes FL, Ambrosio CE, Meirelles FV, et al. Unearthing the roles of imprinted genes in the placenta. *Placenta* 2009; 30:823-34.
37. Wagschal A, Feil R. Genomic imprinting in the placenta. *Cytogenet Genome Res* 2006; 113:90-8.
38. Hiby SE, Lough M, Keverne EB, Surani MA, Loke YW, King A. Paternal monoallelic expression of PEG3 in the human placenta. *Hum Mol Genet* 2001; 10:1093-100.
39. Ono R, Kobayashi S, Wagatsuma H, Aisaka K, Kohda T, Kaneko-Ishino T, et al. A retrotransposon-derived gene, PEG10, is a novel imprinted gene located on human chromosome 7q21. *Genomics* 2001; 73:232-7.
40. McMinn J, Wei M, Sadowsky Y, Thaker HM, Tycko B. Imprinting of PEG1/MEST isoform 2 in human placenta. *Placenta* 2006; 27:119-26.
41. Vambergue A, Fajardy I, Dufour P, Valat AS, Vandersippe M, Fontaine P, et al. No loss of genomic imprinting of IGF-II and H19 in placentas of diabetic pregnancies with fetal macrosomia. *Growth Horm IGF Res* 2007; 17:130-6.
42. Kainz B, Shehata M, Bilban M, Kienle D, Heintel D, Kromer-Holzinger E, et al. Overexpression of the paternally expressed gene 10 (PEG10) from the imprinted locus on chromosome 7q21 in high-risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer* 2007; 121:1984-93.
43. Pliushch G, Schneider E, Weise D, El Hajj N, Tresch A, Seidmann L, et al. Extreme Methylation Values of Imprinted Genes in Human Abortions and Stillbirths. *Am J Pathol* 2010; DOI:10.2353/ajpath.2010.090764.
44. Moore T. Genetic conflict, genomic imprinting and establishment of the epigenotype in relation to growth. *Reproduction* 2001; 122:185-93.
45. Kinoshita T, Ikeda Y, Ishikawa R. Genomic imprinting: a balance between antagonistic roles of parental chromosomes. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19:574-9.
46. Bobetsis YA, Barros SR, Lin DM, Weidman JR, Dolinoy DC, Jirtle RL, et al. Bacterial infection promotes DNA hypermethylation. *J Dent Res* 2007; 86:169-74.
47. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:36.

©2010 Landes Bioscience.
Do not distribute.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Estudo citogenético em produtos de abortamento e mortes fetais

A maioria das concepções humanas é geneticamente anormal e termina em abortamento, que é, na verdade, a complicação mais comum da gravidez. Estima-se que 10 a 15% das gravidezes clinicamente reconhecidas terminem em abortamento ou em morte fetal (Rai and Regan, 2006).

A perda recorrente de gravidez afecta cerca de 5% dos casais que pretendem uma gravidez e a identificação da causa é um desafio para o clínico (Stephenson and Kutteh, 2007). As causas genéticas estão muitas vezes presentes e deverão ser sempre investigadas. Quando uma anomalia cromossómica é identificada num dos membros do casal é possível estabelecer um prognóstico para uma futura gravidez e, na maioria das situações, oferecer um diagnóstico pré-natal. A perda esporádica da gravidez, especialmente a que ocorre durante o primeiro trimestre de gravidez, tem como causa principal a presença de aneuploidias. Os dados da literatura referem que cerca de 50% dos abortamentos espontâneos possuem anomalias cromossómicas, 29% dos quais devido a alterações numéricas dos autossomas, 10% devido a monossomia do cromossoma X, 10% devido a poliploidias e 2% devido a mosaicismo ou anomalias estruturais (Kalousek et al., 1993).

Apesar de habitualmente a ocorrência de um primeiro abortamento, ou mesmo de um segundo, não ter indicação para estudo citogenético, com o objectivo de fazer a caracterização das principais anomalias cromossómicas presentes em produtos de abortamento ou em mortes fetais na população portuguesa, foi estabelecido um protocolo com o Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de São João no sentido destas amostras serem enviadas para o Serviço de Genética da Faculdade de Medicina do Porto.

No primeiro artigo desta Tese (**Artigo I**) pretendemos desenvolver um protocolo optimizado que permitisse estudar o complemento cromossómico em produtos de abortamento ou mortes fetais, fazendo a caracterização das anomalias cromossómicas presentes. Para tal, o estudo foi desenhado no sentido de incluir de uma forma sequencial as técnicas de

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

citogenética convencional (cariótipo), Hibridação Genómica Comparativa (CGH) e Hibridação *in situ* de Fluorescência (FISH).

Para o estudo citogenético dos abortamentos espontâneos ou de tecido fetal/placenta é necessário a obtenção de tecidos viáveis, estabelecimento e manutenção de culturas primárias e obtenção de cromossomas metafásicos para análise. Esta técnica é laboriosa, tendo algumas limitações, como a falência de culturas (10-40%) (Lomax et al., 2000), contaminação externa e crescimento selectivo de células maternas (Bell et al., 1999), o que implica que o achado de um cariótipo feminino normal possa não ser representativo do feto.

Devido à falha das culturas, somente em cerca de 60-70% dos casos de abortamentos espontâneos é possível obter um resultado de cariótipo usando a técnica convencional de cultura celular. Esta limitação torna não informativos muitos dos estudos efectuados, não permitindo um aconselhamento genético adequado aos casais que experimentam abortamentos de repetição, assim como provoca insatisfação a quem requer um exame que poderá em muitos dos casos justificar a causa do abortamento espontâneo e evitar o pedido de outros exames complementares de diagnóstico. O insucesso de cultura, associado à cultura de produtos de abortamento, depende de vários factores, salientando-se: (a) o período de tempo que decorreu desde a morte *in utero* até à recepção da amostra no laboratório de citogenética, uma vez que pode comprometer a viabilidade celular (as células têm de estar vivas para se poderem cultivar), (b) o grau de acuidade na colheita das amostras no que diz respeito à ausência de contaminação externa e que conduz à falência da cultura, e (c) a experiência do obstetra na colheita dos tecidos fetais que deverão ser enviados ao laboratório de citogenética, de forma a evitar, tanto quanto possível, a contaminação materna.

A Hibridação Genómica Comparativa (CGH) é uma técnica que permite detectar ganhos ou perdas de segmentos cromossómicos recorrendo a uma hibridação *in situ* de fluorescência reversa (Kallioniemi et al., 1992). Considerando (a) a possibilidade de detectar sem ambiguidade a origem de material cromossómico extra ou em falta, (b) o rastreio completo do genoma para anomalias desequilibradas e (c) o facto de depender apenas da

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

extracção de DNA da amostra a ser analisada, em vez da realização de preparações cromossómicas em metafase, a sua aplicação tem grandes vantagens no estudo de produtos de abortamento ou material fetal. Pelas vantagens que apresenta face a outras técnicas de citogenética, a técnica de CGH foi aplicada ao estudo de produtos de abortamento nos casos em que não se verificou crescimento celular. Actualmente, com a total disponibilização e comercialização de metodologia com maior resolução, a metodologia tradicional tem sido substituída pelos *arrays* CGH, pelo que, presentemente, só faria sentido o estudo de novos casos com a aplicação da metodologia de *arrays* CGH. A técnica de CGH, não invalidando o estudo citogenético convencional (muito útil em caso de sucesso de cultura), surgiu neste trabalho como uma mais-valia, permitindo o estudo sistemático de todos os produtos de abortamento com indicação para estudo citogenético, sendo apenas necessário cerca de 1µg de DNA do caso a estudar e permitindo ainda o estudo retrospectivo de produtos de abortamento armazenados em blocos de parafina, após fixação ou congelados a -80°C.

No **Artigo I** foram estudados 232 produtos de abortamento/mortes fetais e verificou-se 25,4% de falência de cultura. A técnica de CGH foi aplicada nestes casos com conteúdo cromossómico desconhecido e permitiu detectar em 15/58 casos estudados um complemento cromossómico anormal: três monossomias X; um ganho de X; um, dois e sete casos com ganhos dos cromossomas 18,16 e15, respectivamente; um caso com ganho do cromossoma 21 (Tabela 2, Artigo I). Catorze destes casos foram detectados em amostras do primeiro trimestre e um caso no segundo trimestre de gravidez. Uma vez que a técnica de CGH não detecta alterações de ploidia (Lomax et al., 2000), e sabendo que cerca de 10% das perdas fetais precoces correspondem a triploidias (Daniely et al., 1998), foi necessário realizar posteriormente outra técnica que permitisse a sua detecção. A técnica de FISH permite de uma forma relativamente simples a detecção da presença ou ausência de determinadas sequências cromossómicas. Com excepção das sondas de pintura cromossómica, a FISH pode ser aplicada ao estudo de núcleos em interfase, eliminando a necessidade de obtenção de metafases, reduzindo o tempo de preparação

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

celular e a possibilidade de artefactos inerentes à própria cultura e permitindo ainda uma análise rápida de um grande número de células.

Com o objectivo de aplicar a técnica de FISH ao estudo dos produtos de abortamento que tinham um complemento cromossómico aparentemente normal no perfil de CGH, optimizou-se uma técnica de FISH que se designou de Touch FISH (**Artigo I e III – Material e Métodos**). Para a realização da técnica, utilizámos parte do material (restos ovulares, tecido fetal ou placenta) que havia sido congelado a -80°C desde o dia em que foi recebido para estudo citogenético e iniciada a cultura celular. O resultado obtido pela técnica de Touch FISH deverá representar o estado *in vivo* do tecido a ser analisado, uma vez que o estudo é realizado directamente sobre células que não foram sujeitas a cultura celular.

No estudo realizado no **Artigo I**, a técnica de Touch FISH permitiu detectar 19 casos anormais, incluindo 3 casos com triploidia que não foram detectados pelo perfil de CGH. Num outro caso (Tabela 2 do Artigo I, caso 74392) o perfil de CGH indicava um ganho de material do cromossoma X, mas apenas com a técnica de Touch FISH foi possível confirmar que se tratava de uma triploidia e não de um cariótipo XXY. No caso 70253 foi ainda detectada contaminação materna, uma vez que o perfil de CGH indicava um complemento cromossómico feminino e a técnica de Touch FISH indicou a presença de algumas células com um complemento cromossómico masculino. Este facto salienta uma das grandes vantagens da técnica de FISH em detectar de uma forma muito eficiente situações de mosaicismo, mesmo de baixo grau (<5%). A técnica permite também desta forma avaliar a existência e o grau de contaminação materna, um problema que é relativamente frequente quando se cultivam amostras provenientes do primeiro trimestre de gravidez.

Aproveitando as vantagens de cada uma das três técnicas utilizadas neste trabalho e estabelecendo um protocolo sequencial, (1) realização de cariótipo, (2) realização da técnica de CGH nos casos sem crescimento celular e (3) realização da técnica de Touch-FISH para estudo de ploidia e confirmação dos resultados anormais do CGH, foi possível caracterizar citogeneticamente 232 produtos de abortamentos e/ou mortes fetais, na população Portuguesa.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

A maioria das alterações encontradas neste trabalho foi alterações numéricas (93,9%): 60% trissomias, 10% monossomias X, 21% de poliploidias e os restantes 9% corresponderam a situações de mosacismo (Goddijn and Leschot, 2000; Lomax et al., 2000; Stephenson and Kutteh, 2007; Warren and Silver, 2008), o que está de acordo com o que está publicado na literatura.

Estima-se que o abortamento recorrente afecte cerca de 1-5% dos casais que pretendem uma gravidez (Carrington et al., 2005; Christiansen, 2007; Rai and Regan, 2006; Stephenson and Kutteh, 2007; Warren and Silver, 2008; Yang et al., 2006). A presença de anomalias estruturais num dos membros do casal é uma das possíveis etiologias, estimando-se que 2-8% destes casais sejam portadores de rearranjos cromossómicos, nomeadamente translocações recíprocas equilibradas e inversões (De Braekeleer and Dao, 1990; Goddijn et al., 2004; Sugiura-Ogasawara et al., 2004). Apesar destes portadores terem habitualmente fenótipo normal, poderão ter a fertilidade reduzida, abortamentos consecutivos ou obterem uma gravidez de termo com nascimento de uma criança com cariótipo anormal devido a segregação desequilibrada. O risco reprodutivo de cada translocação recíproca depende da extensão do material cromossómico trocado, dos cromossomas envolvidos e do número de locais de quebra envolvidos.

Dos 232 casos estudados, 29 casais apresentavam história clínica de abortamentos recorrentes (3 ou mais abortamentos, consecutivos ou não). Foram encontradas 16 anomalias cromossómicas: duas monossomias X, uma aneuploidia dupla em mosaico (45,X/46,X,+2), uma trissomia 9, quatro trissomias 16, 4 triploidias, uma tetraploidia em mosaico e duas alterações estruturais desequilibradas. Excluindo os dois casos de alterações estruturais, que não estão relacionados com a idade materna, a idade materna média nos 14 casos com aneuploidias foi de 31.8, o que permite, à partida, para estes casos, excluir a idade materna como um factor de risco para as aneuploidias fetais.

Em abortamentos do primeiro trimestre, a recorrência de aneuploidias é mais elevada do que a esperada só pelo acaso. Assumindo a existência de aneuploidias recorrentes, e considerando que cerca de 50% de todos os

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

abortamentos são citogeneticamente anormais, então será de esperar uma ocorrência semelhante de aneuploidias nos abortamentos recorrentes e nos esporádicos (Simpson, 2007). De facto, a maioria dos estudos está de acordo com esta teoria. Segundo Carp, num artigo de revisão publicado em 2008, a incidência de anomalias cromossómicas, nomeadamente de aneuploidias nos abortamentos recorrentes é cerca de 41% (Carp, 2008a). Outros estudos indicaram uma prevalência de anomalias cromossómicas em produtos de abortamento (recorrentes) de 57% (Stern et al., 1998) e de 48% (Stephenson et al., 2002). Dos 30 produtos de abortamentos provenientes dos 29 casais com abortamentos recorrentes, 16 (53,3%) apresentavam anomalias cromossómicas, o que está de acordo com o descrito na literatura, sendo de salientar que todos eram provenientes do primeiro trimestre de gravidez.

Adicionalmente, alguns estudos indicaram que pacientes com um abortamento anterior cujo complemento cromossómico era aneuplóide parecem ter melhor prognóstico para uma gravidez com sucesso do que pacientes com abortamentos anteriores euplóides (Carp et al., 2001; Carp, 2008a; Ogasawara et al., 2000). Por oposição, outros estudos indicaram que os complementos cromossómicos dos produtos de abortamento em cada família tendem a ser recorrentemente normais ou anormais (Bianco et al., 2006; Warburton et al., 1987). Munné e colaboradores estudaram a taxa de aneuploidias encontrada nos embriões de mulheres com história anterior de uma concepção aneuplóide e submetidas a DGPI e concluíram que a história prévia de uma gravidez com uma trissomia, incluindo trissomias viáveis ou não, estava associada a um risco mais elevado de uma concepção aneuplóide numa próxima gravidez (Munne et al., 2004). Estes diferentes estudos, salientam a importância de uma boa avaliação de toda a história clínica de cada casal com abortamentos recorrentes, de forma a que possa ser reconhecida uma situação de recorrência de aneuploidias ou de um abortamento aneuplóide esporádico (tendo em conta que é um acontecimento muito frequente), num casal que poderá ter outra patologia que possa justificar a recorrência dos abortamentos. Esta possibilidade é corroborada por Carp que identificou produtos de concepção com trissomia 16 em duas pacientes, uma das quais tinha sido diagnosticada como sendo

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

portadora de factores trombofílicos hereditários e a outra paciente possuía um defeito do septo uterino (Carp, 2008b).

Goddijn e colaboradores estudaram uma população de 1324 casais com abortamentos recorrentes e encontraram 51 casais (3,9%) com anomalias cromossômicas estruturais, tendo sido excluídos posteriormente do estudo 10 casais por informação incompleta dos dados clínicos. Dos 41 casais que apresentaram no estudo, em 27 casos, o portador do rearranjo cromossômico era o progenitor feminino e em 14 casos era o progenitor masculino. Os tipos de anomalias cromossômicas encontradas foram 26 casos de translocações recíprocas equilibradas, 9 casos de inversões, 3 casos de translocações Robertsonianas, um caso de um marcador do cromossoma 15 e dois casos de um rearranjo desequilibrado envolvendo material adicional proveniente do cromossoma Y em duas mulheres.

Na nossa casuística foi possível obter informação clínica de 29 casais com abortamentos recorrentes, sendo um casal (3,4%) portador de uma translocação equilibrada envolvendo os cromossomas 4 e 6 (progenitor masculino). As duas alterações estruturais desequilibradas encontradas nos produtos de abortamento da nossa população corresponderam a duas gestações diferentes do mesmo casal. A indicação para DGPI deverá ser ponderada no âmbito de uma consulta de aconselhamento genético, nomeadamente nos casos cujo risco de nascimento de uma criança com malformações ou atraso mental resultante de segregações desequilibradas seja elevado (>10%). Para este casal, o risco é de 4,68% [2,8 -7,72] (risco calculado pelo HCForum, www.hc-forum.net).

Considerando agora a patologia cromossômica encontrada na nossa casuística, após a realização do protocolo sequencial referido anteriormente, verificou-se que 85/232 casos (36,6%) revelaram um cariótipo anormal. Esta incidência mais baixa do que a descrita na literatura poderá estar relacionada com a presença de um excesso de contaminação materna nas amostras do primeiro trimestre, mas também pelo facto de o estudo incluir amostras provenientes dos três trimestres de gravidez. Considerando apenas os casos do primeiro trimestre, a percentagem de casos com cariótipo anormal é de 43,5%.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

A presença de contaminação materna é uma das dificuldades encontradas na cultura de células provenientes de produtos de abortamento, estimando-se que 30 a 40% dos cariótipos 46,XX poderão ser de origem materna (Bartels et al., 1990; Bell et al., 1999; Jarrett et al., 2001; Karaoguz et al., 2005). Num trabalho recente Karaoguz e colaboradores (2010) analisaram 38 produtos de abortamento cultivados a partir da selecção de vilosidades coriônicas e com cariótipo normal XX. O estudo incluiu a pesquisa de sequências do cromossoma Y e genotipagem usando marcadores microssatélite para o cromossoma X. Neste estudo, os autores concluíram que 16/38 (42,1%) das amostras possuíam sequências do cromossoma Y e que 18/38 apresentavam contaminação materna (Karaoguz et al., 2010). Este estudo salienta a importância da exclusão de contaminação materna nos abortamentos do primeiro trimestre, nomeadamente quando o material recebido se trata de restos ovulares. Nos nossos casos com cariótipo normal, também se verificou um excesso de fetos do sexo feminino (96/147, 65,3%; razão 1.9).

No **Artigo III** incluído nesta Tese analisaram-se 328 produtos de abortamento ou mortes fetais com cariótipo realizado, detectando-se 181 casos com cariótipo 46,XX, 60 com cariótipo 46,XY e os restantes apresentavam cariótipo anormal. A técnica de MLPA, usando o kit P095 que permite detectar as aneuploidias dos cromossomas 13, 18 e 21 e ainda X e Y, foi realizada nos 328 casos. Em 12 casos foi detectada discrepância de sexo entre o resultado do MLPA e o cariótipo. A técnica de Touch-FISH foi realizada nestes 12 casos e permitiu confirmar a presença de células com sinal positivo para o cromossoma Y (células fetais) juntamente com células positivas para dois cromossomas X (células maternas). A técnica de Touch FISH tem a vantagem de analisar as células do tecido original, não havendo exposição a cultura celular que poderá induzir o crescimento preferencial de células maternas, permitindo ainda a detecção de mosaicismo mesmo de baixo grau (<5%). A técnica de MLPA tem a vantagem, por sua vez, de ser económica, de fácil execução e permitir a análise de um número elevado de casos muito rapidamente. A aplicação desta técnica ao estudo de produtos de abortamento revelou-se por isso, extremamente útil, tendo sido em alguns casos a única técnica em que foi possível obter um resultado (**Artigo II**). A

aplicação da técnica de QF-PCR poderá também ser uma mais valia uma vez que permite, para além da detecção das aneuploidias mais comuns, a detecção de triploidias e a detecção de contaminação materna.

No **Artigo I**, como foi referido anteriormente, em 85/232 foi detectado um cariótipo anormal. Destes, 81/85 eram alterações numéricas. A alteração mais frequentemente encontrada foi a trissomia do cromossoma 16, seguida da trissomia 15, triploidia e monossomia do cromossoma X o que está de acordo com esperado segundo a literatura (Goddijn and Leschot, 2000; Simpson and Bombard, 1987; Stephenson and Kutteh, 2007; Warren and Silver, 2008).

Desde a identificação da primeira aneuploidia humana, em 1959 (Lejeune et al., 1959), que a investigação tem procurado responder a três questões básicas: Qual a frequência (e relevância clínica) das aneuploidias? Qual a origem (meiótica/mitótica e parental) do cromossoma extra ou em falta? Quais os mecanismos moleculares subjacentes à não-disjunção que favorecem a ocorrência de aneuploidias?

A primeira destas questões foi já respondida tendo em conta que pelo menos 5% de todas as gravidezes clinicamente reconhecidas são trissómicas (Hassold et al., 2007). A maioria das gravidezes termina *in utero* o que torna as aneuploidias, com já foi referido anteriormente, a causa mais comum de abortamento espontâneo. Pelo facto de existirem aneuploidias compatíveis com a vida, como é o caso da trissomia 21, isto torna-as também a causa mais frequente para defeitos congénitos ao nascimento e/ou atraso mental.

A maioria dos estudos realizados para responder à pergunta “qual a origem do cromossoma extra em falta?” focou-se nas trissomias, especialmente as compatíveis com a vida (trissomias dos cromossomas 21 e 18 e ainda as condições XXY e XXX). A maioria dos estudos concluiu que a maior parte das trissomias são originadas na oogénese, sendo os erros em meiose I materna mais frequentes do que os erros em meiose II materna, e a proporção de casos de origem materna aumenta com a idade materna (Hassold and Hunt, 2001).

No entanto, existem diferenças significativas nos mecanismos de não-disjunção entre os diferentes cromossomas. Por exemplo, a grande maioria dos casos de trissomia 21 resulta de erros em meiose I materna, as

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

trissomias do cromossoma 16 são até à data exclusivamente de origem materna em meiose I, as trissomias do cromossoma 18 resultam habitualmente de erros em meiose II materna e as monossomias do cromossoma X resultam mais frequentemente de erros de origem paterna. Presumivelmente, estes diferentes padrões poderão reflectir diferenças na arquitectura genómica de cada cromossoma individualmente. A investigação, actualmente, está centrada na identificação das bases moleculares da não-disjunção meiótica, na melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pelo aumento da incidência de aneuploidias devido à idade materna e, ainda mais recentemente, no desenvolvimento de terapias que reduzam ou eliminem a não-disjunção (Hassold et al., 2007).

Os nossos resultados permitiram ainda confirmar, em concordância com a literatura, que a média das idades maternas nos casos com anomalias cromossómicas foi superior à dos casos com cariótipo normal (32,9 versus 31,4), sendo ainda esse valor mais significativo se consideramos apenas os casos de trissomias versus casos normais (34,8 versus 31,4).

Foram detectadas, para além das trissomias simples, 3 casos de trissomias duplas, 1 caso de trissomia tripla e 1 caso de uma aneuploidia dupla em mosaico (total=2,2%). A frequência estimada na literatura para as trissomias duplas varia entre 0,21 a 2,8% (Micale et al., 2010). Também segundo a literatura, a maioria das concepções de trissomias duplas são perdidas no primeiro trimestre, sendo as idades gestacionais significativamente inferiores às das concepções de trissomias simples. As médias das idades gestacionais das concepções com trissomia dupla foram de $6,9 \pm 1,7$ semanas na revisão de Micale *et al* (2010), $8,2 \pm 1,7$ e $9,2 \pm 5,7$ nas casuísticas de Reddy (1997) e Diego-Alvarez *et al* (2006), respectivamente. Na nossa casuística, a média das idades gestacionais foi de $8,2 \pm 1,5$ semanas para as aneuploidias duplas (incluindo a trissomia tripla) e de $9,3 \pm 4,1$ nas concepções com trissomias simples, o que está de acordo com o referido na literatura. No que diz respeito às idades maternas, nas concepções com trissomias duplas/tripla e simples a média foi de $35,2 \pm 8,8$ e $34,7 \pm 5,5$ semanas, respectivamente, não havendo diferenças significativas entre os dois valores. Na literatura está descrito um aumento significativo da média da idade materna nos casos com trissomias duplas. Porém, o número

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

reduzido de casos da nossa casuística poderá justificar o facto de não existirem diferenças significativas entre os dois grupos. É de referir, no entanto, que duas das cinco grávidas portadoras de concepções com trissomia dupla/tripla (48,XY,+20,+21 e 49,XX,+7,+16,+22) tinham na altura da concepção, 43 e 44 anos, respectivamente.

No que diz respeito às combinações das trissomias duplas encontradas no nosso estudo e comparando com a revisão de 2010 de Micale e colaboradores, que reúne os 385 casos publicados, foi possível verificar que a combinação cromossómica +2+6 não foi ainda descrita na literatura. O facto do cromossoma 6 ser um dos cromossomas que aparece menos vezes envolvido em trissomias duplas (o quarto cromossoma menos envolvido) poderá explicar este facto. Até à data, os cromossomas 1 e 19 nunca foram observados em combinação com outros cromossomas. A presença de um grande desequilíbrio genético poderá justificar este facto, uma vez que o cromossoma 1 é o maior cromossoma da espécie humana (3380 genes) e o cromossoma 19 é o que possui maior densidade de genes (33,8 genes/MB). No entanto, outros mecanismos deverão também estar envolvidos, uma vez que o cromossoma 16 tem um conteúdo génico muito denso (terceiro mais denso) e, adicionalmente ao facto de ser a trissomia simples mais frequentemente encontrada em produtos de abortamento, em trissomia dupla é o segundo autossoma mais vezes observado. A ocorrência de modificações epigenéticas por um mecanismo de *imprinting* genómico tem sido sugerido como um factor que poderá contribuir para uma maior ou menor viabilidade dos fetos portadores de diferentes combinações de concepções trissómicas duplas. Outra possibilidade inclui a presença de genes com elevado impacto no desenvolvimento fetal muito sensíveis a variações de dosagem e que acarretam inviabilidade fetal (Micale et al., 2010). Outra explicação, baseia-se na teoria que para além do efeito de sobre-regulação que advém da presença de um cromossoma adicional afectado (trissomia) poderá existir um efeito secundário do próprio desequilíbrio na dosagem génica da expressão génica global, ou seja, no chamado transcriptoma (Altug-Teber et al., 2007; FitzPatrick et al., 2002). No caso das trissomias duplas, este efeito poderá ainda ser ampliado.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

No **Artigo III** realizou-se o cariótipo a 328 amostras de produtos de abortamento ou mortes fetais. Para além da avaliação de contaminação materna, realizou-se a técnica de Touch FISH nos casos em cujo cariótipo foram identificadas células tetraplóides ($4n=92$ cromossomas). Sabe-se que a presença de células tetraplóides em mosaico em células de líquido amniótico ou em culturas provenientes de produtos de abortamento está frequentemente associada a artefactos de cultura (Karaoguz et al., 2005; Lomax et al., 2000). Por outro lado, estima-se que cerca de 1,3% dos abortamentos do primeiro trimestre sejam devidos a tetraploidias verdadeiras (Boue et al., 1975).

Dos 328 casos estudados, 14 apresentavam uma proporção elevada de células tetraplóides no cariótipo. A realização da técnica de Touch FISH permitiu demonstrar que apenas 7 casos correspondiam a mosaicismos verdadeiros sendo os restantes considerados artefactos de cultura. Este estudo permitiu verificar que a técnica de Touch FISH realizada directamente no tecido fetal ou na placenta, sem interferência de uma cultura *in vitro*, se mostrou uma metodologia muito eficiente na distinção entre mosaicismo verdadeiro e artefactos de cultura.

O **Artigo II** teve como objectivo aplicar a técnica de MLPA ao estudo dos produtos de abortamento ou mortes fetais. Foram estudadas 489 amostras, utilizando o kit SALSA P095, que permite detectar aneuploidias envolvendo os cromossomas 13, 18, 21, X e Y. Em 38/489 (7,8%) a técnica de MLPA detectou a presença de aneuploidias, incluindo onze trissomias 21, onze monossomias do cromossoma X, seis trissomias 18, quatro trissomias 13, quatro triploidias XXY, uma monossomia 21 e um caso de dissomia Y (XYY). Por outro lado, só foi possível obter um resultado do cariótipo em 328 amostras, devido a ausência de crescimento celular, contaminação externa e ainda porque este estudo incluiu a análise retrospectiva de 13 amostras conservadas em parafina, nas quais não tinha sido previamente solicitado o estudo do cariótipo. Nos 161 casos sem resultado de cariótipo, a técnica de MLPA detectou 13 (8,1%) aneuploidias, permitindo um diagnóstico rápido e económico, não sendo necessário recorrer a outras técnicas também eficientes mas mais laboriosas e mais caras como é o caso das técnicas de Touch FISH ou da CGH. Nos 328 casos em que foi possível estudar, em

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

simultâneo, o cariótipo e a técnica de MLPA verificou-se que 64 casos com anomalias cromossômicas só foram detectados pelo cariótipo, uma vez que o kit SALSA P095, como já foi referido, só permite detectar aneuploidias dos cromossomas 13, 18, 21, X e Y, ficando por detectar outras aneuploidias muito comuns em produtos de abortamento como as trissomias dos cromossomas 16, 15 e 22, triploidias XXX e a quase totalidade das alterações estruturais. Por outro lado, em 10/489 amostras demonstrou-se a presença de contaminação materna no cariótipo (46,XX) devido à detecção do cromossoma Y por MLPA, com uma razão entre o cromossoma Y/X baixa, o que é fortemente sugestivo de contaminação materna. Estes resultados foram posteriormente confirmados por Touch FISH.

Os resultados obtidos salientam a importância da utilização de mais uma técnica, conjugando as técnicas de citogenética (cariótipo, FISH ou CGH) com as técnicas de biologia molecular (MLPA ou QF-PCR), o que permite aumentar a detecção de um maior número de casos com anomalias cromossômicas, que poderiam não ser identificadas caso fosse necessário optar por apenas uma das técnicas.

A introdução dos kits de MLPA SALSA P036 e P070 que analisam as regiões subteloméricas de todos os cromossomas (com excepção dos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos), poderá ser útil na detecção de todas as trissomias presentes nos produtos de abortamento ou ainda de alterações desequilibradas que envolvam as regiões terminais dos cromossomas (Bruno et al., 2006; Diego-Alvarez et al., 2007). No entanto, a aplicação destes kits ao estudo de produtos de abortamento não nos possibilitou, pelo menos até à data e no nosso Laboratório, a obtenção de resultados totalmente fidedignos que nos permitam estabelecer um diagnóstico com segurança.

A técnica de MLPA usando o kit P095 é uma técnica rápida, económica, automática e bastante fidedigna para o estudo das aneuploidias referidas, não necessitando de células vivas, nem em cultura, e requerendo apenas quantidades mínimas de DNA para analisar. O uso desta técnica juntamente com o cariótipo e outras técnicas de citogenética molecular, no estudo de produtos de abortamento, parece ser muito útil, permitindo um resultado muito rápido e tendo especial relevância em casos de falência de cultura.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Estudo de alterações de genes imprinted em produtos de abortamento e mortes fetais

O *imprinting* genómico é um mecanismo essencial ao desenvolvimento humano, que causa expressão monoalélica de genes, que estão dependentes da origem parental. Tem sido demonstrado que este fenómeno desempenha um papel importante no desenvolvimento fetal e da placenta (Fowden et al., 2006; Miozzo and Simoni, 2002). Apesar de se saber que a maioria dos genes *imprinted* são expressos nos tecidos extraembrionários, nomeadamente na placenta, existe ainda pouca informação sobre quais os mecanismos reguladores desta expressão monoalélica no crescimento, desenvolvimento e funções da placenta (Coan et al., 2005; Wagschal and Feil, 2006).

A embriogénese e a placentação estão particularmente sujeitas a perturbações na expressão génica, uma vez que estes processos dependem de uma série de eventos bastante complexos. Qualquer alteração da expressão destes factores de regulação “tão bem orquestrada” pode levar a patologias placentárias que causem fenótipos indesejáveis ou mesmo abortamento ou morte precoce. Os genes *imprinted* têm importantes funções na regulação do crescimento placentário e fetal (Wagschal and Feil, 2006). Desempenham um papel crucial em determinadas patologias que atingem a placenta, como no caso da mola hidatiforme, displasia mesenquimatosa e restrição de crescimento fetal e ainda nos chamados Síndromes do *Imprinting* como é o caso do Síndrome de Prader-Willi (PWS), Angelman (AS), Beckwith-Wiedemann (BWS) e Silver-Russel (SRS).

Os genes *imprinted* são expressos selectivamente pelo alelo materno ou pelo paterno. Esta forma especializada de regulação é necessária para um desenvolvimento normal. Nos genes *imprinted* por via paterna, a transcrição do alelo paterno é epigeneticamente modificada, conduzindo a uma expressão monoalélica materna. O mesmo acontece nos genes com *imprinting* materno, só que neste caso o alelo expresso é o paterno (Ferguson-Smith and Surani, 2001; Jones and Takai, 2001). Segundo a

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

literatura, esta expressão selectiva poderá ter um papel importante na distribuição dos recursos maternos para o crescimento fetal (Constancia et al., 2005; Reik et al., 2003).

Foi objectivo do **Artigo IV** estudar outras causas genéticas, para além das cromossómicas, que possam estar envolvidas ou interferir em processos que causem um abortamento espontâneo ou a morte fetal. Uma vez que se sabe que os genes *imprinted* desempenham um papel importante na regulação do crescimento fetal e da placenta, propusemo-nos estudar a expressão de 4 genes *imprinted* (*IGF2*, *PHLDA2*, *PEG10* e *CDKN1C*) em amostras de produtos de abortamentos ou mortes fetais nos três trimestres de gravidez. Até à data e segundo o nosso conhecimento, este trabalho é o primeiro estudo publicado que apresenta resultados sobre alterações da expressão de genes *imprinted* em abortamentos espontâneos ou mortes fetais, nos três trimestres da gravidez, em humanos.

Vários estudos foram já realizados com o objectivo de avaliar a expressão de genes *imprinted* na placenta humana (Antonazzo et al., 2008; Apostolidou et al., 2007; Diplas et al., 2009; McMinn et al., 2006b; Ono et al., 2001; Salas et al., 2004; Vambergue et al., 2007; Wagschal and Feil, 2006). No entanto, poucos estudaram a alteração da expressão associada a perdas de gravidez (Ono et al., 2006; Ostojic et al., 2008; Plushch et al., 2010).

Neste estudo, avaliaram-se 4 genes *imprinted*, dois expressos por via paterna (*IGF2* e *PEG10*) e dois expressos por via materna (*PHLDA2* e *CDKN1C*), utilizando a técnica de *quantitative Real-Time PCR* (qRT-PCR) com ensaios de expressão *TaqMan probes*. Foram ainda estudados dois genes *housekeeping* (*GADPDH* e *ACTB*) para servirem como controlos endógenos (ver material e métodos do **Artigo IV**). Foram analisadas 54 amostras, colhidas a partir de fragmentos ovulares, tecido fetal ou de placenta de 38 mulheres que sofreram um abortamento espontâneo ou uma morte fetal. Estas amostras foram sujeitas a estudo cromossómico prévio (**Artigos I, II e III**) e apenas as que apresentaram cariótipo normal foram seleccionadas para estudo. Paralelamente, seleccionaram-se 18 casos (amostras de tecido fetal ou de placenta) que serviram de controlo, emparelhadas de acordo com a idade gestacional aproximada aos casos a serem estudados, e provenientes

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

de abortamentos de causa conhecida (infecções, causas maternas e dois casos de interrupção voluntária da gravidez às 6 e 9 semanas de gravidez).

Os quatro genes estudados (*IGF2*, *PHLDA2*, *PEG10* e *CDKN1C*) apresentaram uma expressão aumentada no segundo trimestre de gravidez. Para o gene *PHLDA2* verificou-se também a expressão aumentada no primeiro trimestre de gravidez. Segundo a literatura, o gene *PHLDA2* tem sido indicado como um possível marcador do crescimento fetal (Apostolidou et al., 2007; McMinn et al., 2006b).

A maioria dos trabalhos publicados recentemente incidiu sobre o estudo da expressão/metilação de genes humanos *imprinted* em placentas de termo com restrição de crescimento fetal (RCF). De acordo com a literatura sabia-se que os genes *Phlda2* (*imprinting* paterno) e *Mest* (*imprinting* materno) têm habitualmente efeitos oposto no crescimento placentário em ratinho, tendo o gene *Phlda2* o papel de limitar o crescimento e o *Mest* de o promover. (Lefebvre et al., 1998; Salas et al., 2004). McMinn e colaboradores estudaram os mesmos genes em placentas humanas com e sem RCF. Concluíram que o gene *PHLDA2* tinha expressão aumentada nas placentas com RCF, sugerindo um papel directo no controlo do crescimento via supressão (McMinn et al., 2006a). Por outro lado, a perda de expressão deste gene foi observada em molas hidatiformes (Saxena et al., 2003). Apostolidou e colaboradores estudaram por sua vez a expressão do gene *PHLDA2* correlacionando níveis elevados do gene com baixo peso ao nascimento (Apostolidou et al., 2007).

Neste estudo, no primeiro trimestre de gravidez verificou-se que para os quatro genes estudados, apenas o gene *PHLDA2* apresentava um aumento significativo da expressão. No segundo trimestre de gravidez, verificou-se a expressão aumentada dos quatro genes estudados. O gene *PHLDA2* foi o que apresentou uma expressão mais elevada comparando com os outros 3 genes, verificando-se ainda para este gene um aumento da expressão inversamente proporcional à idade gestacional. Assim, os casos com menos de 9 semanas apresentavam para o gene *PHLDA2* os níveis de expressão mais elevados. Foi sugerido que este gene poderia ter um efeito maior na placenta em idades gestacionais mais precoces quando a placenta está mais activa (Apostolidou et al., 2007).

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Analisando os nossos casos com RCF publicados no **Artigo IV**, verificámos uma expressão aumentada do gene *PHLDA2* nas amostras provenientes de tecido fetal, o que está de acordo com o descrito na literatura (McMinn et al., 2006b; Apostolidou et al., 2007; Diplas et al., 2009). Todavia, não confirmámos este aumento de expressão nas amostras provenientes das placentas dos casos com RCIU. É importante referir que a selecção das amostras incluiu todos os casos com indicação de RCF, não se tendo distinguido os casos de RCF em função da sua gravidade clínica.

O gene *CDKN1C* localiza-se junto do gene *PHLDA2* no mesmo domínio cromossómico (DMR2 do cromossoma 11p15.5), sendo também expresso por via materna, e tendo portanto *imprinting* paterno. Estudos em ratinho demonstraram um papel importante como regulador negativo do crescimento embrionário. No ratinho, a dissomia uniparental materna desta região, resulta em atraso de crescimento embrionário e extra-embrionário e letalidade embrionária (Ferguson-Smith et al., 1991). Assim, a expressão aumentada deste gene actua restringindo o crescimento embrionário, enquanto que a perda de expressão promove o crescimento, pelo menos até ao dia E13.5 de gestação. No entanto, ao nascimento, estes embriões não apresentavam excesso de crescimento, sugerindo que o potencial de crescimento não era mantido em fases mais tardias da gestação (Takahashi and Nakayama, 2000; Tunster et al., 2010). Estes estudos, realizados em ratinho, poderão indicar uma coordenação dos genes *Cdkn1c* e *Phlda2* funcionalmente significativa, verificando-se que uma redução da expressão do *cdkn1c* intrinsecamente pode condicionar o aumento do crescimento embrionário e a redução da expressão do *Phlda2* pode permitir um aumento dos recursos extraembrionários necessários para servirem de apoio a um maior crescimento no final da gestação (Saxena et al., 2003; Tunster et al., 2010). A apoiar esta teoria temos o facto do *Cdkn1c* ser considerado uns dos genes com maior impacto na regulação do crescimento embrionário (do domínio IC2 do cromossoma 7, no rato) e saber-se que o gene *Phlda2*, localizado na mesma região desempenha um papel preponderante no desenvolvimento extraembrionário (Andrews et al., 2007; Qian et al., 1997; Tunster et al., 2010).

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Considerando os dois genes, *PEG10* e *IGF2*, expressos por via paterna (*imprinting* materno) estudados no **Artigo IV**, foi possível verificar um aumento de expressão no segundo trimestre de gravidez para ambos os genes. Todavia, no terceiro trimestre de gravidez verificou-se uma inversão deste resultado para o gene *PEG10* que evidenciou uma diminuição significativa da sua expressão. Ono *et al* estudaram o gene *Peg10* em ratinhos *knockout* e concluíram que este gene era essencial para a formação da placenta e que poderia causar letalidade embrionária precoce (Ono et al., 2006). Adicionalmente, o facto de ser um gene muito conservado em todos os mamíferos, sugere que este gene tenha adquirido funções essenciais após ter perdido as suas propriedades de transposição (Ono et al., 2001; Ono et al., 2003).

O gene *IGF2* é considerado dentro dos genes *imprinted* o mais importante factor do crescimento fetal, regulando o crescimento feto-placentário por estimulação da migração trofoblástica (Baker et al., 1993; Constancia et al., 2002; Fowden, 2003). Foi descrito, ainda, como um mitogénio potente e como tendo um efeito autócrino no desenvolvimento pré-implantatório (Hamilton et al., 1998; Lighten et al., 1997). Os níveis de expressão mais elevados deste gene são observados nas células com características mais proliferativas das placentas humanas com idades gestacionais mais precoces: trofoblastos extravilositário, células endoteliais fetais, células do córion mesenquimatoso e citotrofoblasto, nas quais o *IGF2* induz o ciclo celular e modula a proliferação e a maturação trofoblástica (Hedborg et al., 1994; Ohlsson et al., 1989).

Alterações na regulação da expressão deste gene estão associadas a fenótipos patológicos resultando, na maioria, em defeitos de crescimento. Assim, o aumento da expressão do gene *IGF2* causa habitualmente síndrome de Beckwith-Wiedemann caracterizado por macrossomia e predisposição para cancro, enquanto que a expressão diminuída deste gene se associa ao síndrome de Silver-Russel, cujo fenótipo é caracterizado frequentemente por restrição de crescimento pré e pós-natal (Antonazzo et al., 2008).

Apesar do gene *IGF2* ser um dos genes *imprinted* mais bem caracterizados em ratinho, não existem muitos estudos que tenham avaliado a expressão do gene *IGF2* em placentas humanas. Antonazzo e

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

colaboradores estudaram 27 placentas de gravidezes com diagnóstico de RCF, usando a técnica de *real-time* RT-PCR. Concluíram que os valores de expressão do mRNA do IGF2 eram normais, comparando com placentas de gravidezes normais (sem RCF) (Antonazzo et al., 2008). Outros autores, porém, descreveram um aumento dos transcriptos do IGF2 em placentas com RCIU comparando com placentas normais (Abu-Amero et al., 1998). Estes resultados são discordantes do estudo de Antonnazzo. No entanto, é de referir que a metodologia de estudo foi diferente (foi usado RT-PCR semi-quantitativo) e as placentas estudadas foram de termo (no estudo de Antonnazi foram comparadas placentas pré-termo, a partir das 27 semanas). Utilizando *microarrays*, McMinn e colaboradores investigaram a expressão de vários genes, incluindo o gene IGF2. Estes autores descreveram uma diminuição da expressão do IGF2 em 15 placentas de gravidezes com RCF; mas verificou-se uma grande variabilidade caso a caso (McMinn et al., 2006b) e os resultados também não foram validados com a técnica de *real-time* PCR. Shin e colaboradores descreveram um aumento de expressão do IGF2 em placentas de gravidezes com pré-eclampsia comparando com gravidezes normais, sugerindo que esta alteração da regulação normal poderia interferir na invasão trofoblástica causando a pré-eclampsia (Shin et al., 2003). Todavia, na casuística de Antonnazzo e colaboradores, não foram encontradas diferenças significativas nos valores de expressão do gene IGF2 nos casos diagnosticados com hipertensão (Antonazzo et al., 2008). Os nossos resultados parecem estar de acordo com este estudo, uma vez que a expressão do gene IGF2 foi semelhante à dos controlos no terceiro trimestre de gravidez, que será o grupo com as idades gestacionais mais próximas às dos trabalhos referidos anteriormente. Considerando apenas os casos com RCF também não foi possível obter diferenças significativas entre os casos em estudo e os controlos.

De acordo com a teoria do “conflito parental”, o genoma paterno deverá maximizar a extracção de recursos maternos para o benefício da descendência enquanto que o genoma materno terá que gerir esses recursos, armazenando-os de forma a que os possa distribuir de uma forma equilibrada por toda a sua descendência (Constancia et al., 2004). Esta teoria prevê que uma série de genes *imprinted* terá funções antagonistas relacionadas com o

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

crescimento. Assim, os genes expressos por via paterna e materna serão, respectivamente, promotores e supressores do crescimento (Constancia et al., 2005). Os genes *PHLDA2* e *CDKN1C* são expressos por via materna e os genes *IGF2* e *PEG10* por via paterna. Os nossos resultados sugerem que esta teoria poderá não ter aplicação a todos os genes *imprinted* humanos, pelo menos nos casos de perdas de gravidez. É ainda de salientar que, em comparação com os ratinhos, as gravidezes humanas são habitualmente únicas o que implica uma distribuição dos recursos muito menos exigente (Diplas et al., 2009; Monk et al., 2006).

Um dos estudos mais recentes realizados em produtos de abortamento e nados-mortos fez a avaliação do padrão de metilação de 6 genes *imprinted* (*H19*, *MEG3*, *LIT1*, *NESP55*, *PEG3* e *SNRPN*) (Pliushch et al., 2010). Estes autores encontraram hipermetilação em 4% e 18% dos casos de abortamento espontâneo e de nados-mortos, respectivamente. Concluíram também que a maioria dos defeitos epigenéticos se associavam às perdas de gravidez de causa desconhecida, particularmente no segundo trimestre de gravidez (Pliushch et al., 2010). É de referir, no entanto, que estes autores não avaliaram casos provenientes do primeiro trimestre de gravidez. No nosso estudo, as maiores diferenças de expressão foram também encontradas no segundo trimestre de gravidez.

Uma das preocupações do nosso trabalho foi a escolha de controlos adequados, que deveriam ter proveniência de gravidezes normais e das quais resultasse um recém-nascido normal, o que só é possível, em humanos, para estudos em placentas de termo. Uma vez que o estudo foi realizado ao longo da gestação, envolvendo os três trimestres de gravidez, seleccionámos casos de produtos de abortamento ou mortes fetais com causa conhecida, maioritariamente devido a infecções ou a causas maternas/externas (torção do cordão umbilical, descolamento da placenta e interrupção voluntária da gravidez). No entanto, segundo um trabalho publicado na literatura, poderá existir uma correlação entre determinadas infecções bacterianas e ocorrência de hipermetilação da região promotora do gene *IGF2* (Bobetsis et al., 2007). De qualquer forma, caso esta situação se aplicasse aos casos estudados no nosso trabalho, poderia resultar, em última análise, numa sobre-estimativa dos valores de expressão para o gene *IGF2*. Mais estudos que avaliem os

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

padrões de metilação de genes *imprinted* em condições normais e anormais, poderão permitir um melhor entendimento das patologias da gravidez, abortamento espontâneo e da morte fetal ou neonatal.

É importante salientar que, pelo menos até à data, não é possível excluir que os valores de expressão alterada (sobre ou sub-expressão) obtidos de genes *imprinted* em produtos de abortamento ou casos de mortes fetais poderão não ser a causa mas a consequência de um desenvolvimento anormal. Assim, se estas alterações da expressão dos genes são mecanismos adversos ou compensatórios subjacentes à patologia é ainda assunto de investigação.

CONCLUSÕES

Devido ao facto do abortamento espontâneo ser uma das principais complicações da gravidez e ocorrer muito frequentemente na população reprodutiva é muito importante reconhecer a causa e, se possível, calcular um risco para uma futura gravidez. A identificação da causa permite orientar decisões terapêuticas e de aconselhamento genético, assim como reduzir alguma ansiedade habitualmente presente nos casais quando se desconhece a causa.

No **Artigo I**, estabelecendo um protocolo sequencial que incluiu a realização de cariótipo, realização da técnica de CGH nos casos sem crescimento celular e realização da técnica de Touch-FISH para estudo de ploidia e confirmação dos resultados anormais do CGH, foi possível caracterizar o complemento cromossómico em 232 produtos de abortamento e/ou mortes fetais, na população Portuguesa.

A técnica de FISH aplicada nos estudos dos Artigos I e IV foi designada pelo nosso grupo por Touch-FISH, e consistiu na adaptação de um protocolo eficaz que permitisse estudar directamente as células de um tecido pós-congelação, sem interferência de uma cultura *in vitro*. Esta técnica revelou-se uma metodologia muito eficiente na distinção entre mosaicismo verdadeiro e

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

artefactos de cultura e na identificação de contaminação materna em fetos do sexo masculino.

O uso da técnica de MLPA juntamente com o cariótipo e com outras técnicas de citogenética molecular, no estudo de produtos de abortamento, parece ser muito útil, permitindo um resultado muito rápido e tendo especial relevância em casos de falência de cultura.

No seu conjunto, os resultados obtidos nos **Artigos I, II e III** salientam a importância da utilização de mais uma técnica, conjugando as técnicas de citogenética (cariótipo, FISH ou CGH) e as técnicas de biologia molecular (MLPA ou QF-PCR), permitindo aumentar a detecção de um maior número de casos com anomalias cromossômicas, que poderiam não ser identificadas caso fosse necessário optar pela realização de apenas uma das técnicas.

Apesar do interesse crescente no estudo de genes *imprinted* humanos e do reconhecimento da importância dos factores epigenéticos nas patologias humanas, ainda pouco se sabe sobre a regulação dos genes *imprinted* e do seu papel específico no crescimento feto-placentário humano.

No nosso estudo, os quatro genes *imprinted* estudados (*IGF2*, *PHLDA2*, *PEG10* e *CDKN1C*) apresentaram uma expressão aumentada no segundo trimestre de gravidez, verificando-se também para o gene *PHLDA2* uma expressão aumentada no primeiro trimestre de gravidez.

Estes resultados não parecem obedecer, pelo menos para os genes estudados e nos casos de perda de gravidez, ao princípio da “teoria do conflito parental”, não sendo possível, neste momento, avaliar se as alterações observadas nos valores de expressão dos genes estudados serão a causa ou a consequência da patologia.

Até à data e segundo o nosso conhecimento, o trabalho apresentado no **Artigo IV** é o primeiro estudo publicado que apresenta resultados sobre

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

alterações da expressão de genes *imprinted* em abortamentos espontâneos ou mortes fetais, nos três trimestres da gravidez, em humanos.

Este trabalho, no seu conjunto, permitiu a identificação da causa da perda da gravidez em muitos dos casos estudados, o que constitui um avanço de conhecimento sobre a relação entre alterações na expressão de genes *imprinted* e a perda de gravidez.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Amero, S.N., Z. Ali, P. Bennett, J.I. Vaughan, and G.E. Moore. 1998. Expression of the insulin-like growth factors and their receptors in term placentas: a comparison between normal and IUGR births. *Mol Reprod Dev.* 49:229-35.
- Agalioti, T., S. Lomvardas, B. Parekh, J. Yie, T. Maniatis, and D. Thanos. 2000. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell.* 103:667-78.
- Al-Hassan, S., A. Hellani, A. Al-Shahrani, M. Al-Deery, K. Jaroudi, and S. Coskun. 2005. Sperm chromosomal abnormalities in patients with unexplained recurrent abortions. *Arch Androl.* 51:69-76.
- Algar, E.M., G.J. Deebie, and P.J. Smith. 1999. CDKN1C expression in Beckwith-Wiedemann syndrome patients with allele imbalance. *J Med Genet.* 36:524-31.
- Aljicevic, M., E. Beslagic, S. Zvizdic, S. Hamzic, and S. Mahmutovic. 2005. Listeria monocytogenes as the possible cause of the spontaneous abortion in female of the fertile age. *Bosn J Basic Med Sci.* 5:89-92.
- Allason JE and GE Grahnan. 2002. Sex chromosome abnormalities. In Principles and Practice of Medical Genetics. Emery and Rimoin's. Churchill Livingstone, UK.1184-1201.
- Allison, J.L., and D.J. Schust. 2009. Recurrent first trimester pregnancy loss: revised definitions and novel causes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 16:446-50.
- Altug-Teber, O., M. Bonin, M. Walter, U.A. Mau-Holzmann, A. Dufke, H. Stappert, I. Tekesin, H. Heilbronner, K. Nieselt, and O. Riess. 2007. Specific transcriptional changes in human fetuses with autosomal trisomies. *Cytogenet Genome Res.* 119:171-84.
- Andonova, S., R. Vazharova, V. Dimitrova, V. Mazneikova, D. Toncheva, and I. Kremensky. 2004. Introduction of the QF-PCR analysis for the purposes of prenatal diagnosis in Bulgaria--estimation of applicability of 6 STR markers on chromosomes 21 and 18. *Prenat Diagn.* 24:202-8.
- Andrews, S.C., M.D. Wood, S.J. Tunster, S.C. Barton, M.A. Surani, and R.M. John. 2007. Cdkn1c (p57Kip2) is the major regulator of embryonic growth within its imprinted domain on mouse distal chromosome 7. *BMC Dev Biol.* 7:53.
- Anselmo, J., D. Cao, T. Karrison, R.E. Weiss, and S. Refetoff. 2004. Fetal loss associated with excess thyroid hormone exposure. *JAMA.* 292:691-5.
- Antonazzo, P., G. Alvino, V. Cozzi, F.R. Grati, S. Tabano, S. Sirchia, M. Miozzo, and I. Cetin. 2008. Placental IGF2 expression in normal and intrauterine growth restricted (IUGR) pregnancies. *Placenta.* 29:99-101.
- Apostolidou, S., S. Abu-Amero, K. O'Donoghue, J. Frost, O. Olafsdottir, K.M. Chavele, J.C. Whittaker, P. Loughna, P. Stanier, and G.E. Moore. 2007. Elevated placental expression of the imprinted PHLDA2 gene is associated with low birth weight. *J Mol Med.* 85:379-87.
- Arnaud, P., and R. Feil. 2005. Epigenetic deregulation of genomic imprinting in human disorders and following assisted reproduction. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 75:81-97.
- Auvinen, A., M. Vahteristo, H. Arvela, M. Suomela, T. Rahola, M. Hakama, and T. Rytomaa. 2001. Chernobyl fallout and outcome of pregnancy in Finland. *Environ Health Perspect.* 109:179-85.
- Azmanov, D.N., T.V. Milachich, B.M. Zaharieva, G.I. Michailova, V.G. Dimitrova, Z.H. Karagiozova, V.T. Maznejkova, T.A. Chernev, and D.I. Toncheva. 2007. Profile of chromosomal aberrations in different gestational age spontaneous abortions detected by comparative genomic hybridization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 131:127-31.
- Bagislar, S., I. Ustuner, B. Cengiz, F. Soylemez, C.B. Akyerli, S. Ceylaner, G. Ceylaner, A. Acar, and T. Ozcelik. 2006. Extremely skewed X-chromosome inactivation patterns in women with recurrent spontaneous abortion. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 46:384-7.
- Baker, J., J.P. Liu, E.J. Robertson, and A. Efstratiadis. 1993. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell.* 75:73-82.
- Bartels, I., I. Hansmann, and B. Eiben. 1990. Excess of females in chromosomally normal spontaneous abortuses. *Am J Med Genet.* 35:297-8.
- Beever, C.L., M.D. Stephenson, M.S. Penaherrera, R.H. Jiang, D.K. Kalousek, M. Hayden, L. Field, C.J. Brown, and W.P. Robinson. 2003. Skewed X-chromosome inactivation is associated with trisomy in women ascertained on the basis of recurrent spontaneous abortion or chromosomally abnormal pregnancies. *Am J Hum Genet.* 72:399-407.
- Bell, K.A., P.G. Van Deerlin, B.R. Haddad, and R.F. Feinberg. 1999. Cytogenetic diagnosis of "normal 46,XX" karyotypes in spontaneous abortions frequently may be misleading. *Fertil Steril.* 71:334-41.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benkhalifa, M., S. Kasakyan, P. Clement, M. Baldi, G. Tachdjian, A. Demirolo, T. Gurgan, F. Fiorentino, M. Mohammed, and M.B. Qumsiyeh. 2005. Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro. *Prenat Diagn.* 25:894-900.
- Berger, S.L. 2002. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev.* 12:142-8.
- Bernardini, L.M., M. Costa, C. Bottazzi, L. Gianaroli, M.C. Magli, P.L. Venturini, R. Francioso, N. Conte, and N. Ragni. 2004. Sperm aneuploidy and recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online.* 9:312-20.
- Bestor, T., A. Laudano, R. Mattaliano, and V. Ingram. 1988. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol.* 203:971-83.
- Bianco, K., A.B. Caughey, B.L. Shaffer, R. Davis, and M.E. Norton. 2006. History of miscarriage and increased incidence of fetal aneuploidy in subsequent pregnancy. *Obstet Gynecol.* 107:1098-102.
- Bird, A., M. Taggart, M. Frommer, O.J. Miller, and D. Macleod. 1985. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell.* 40:91-9.
- Bobetsis, Y.A., S.P. Barros, D.M. Lin, J.R. Weidman, D.C. Dolinoy, R.L. Jirtle, K.A. Boggess, J.D. Beck, and S. Offenbacher. 2007. Bacterial infection promotes DNA hypermethylation. *J Dent Res.* 86:169-74.
- Boue, A., and P. Gallano. 1984. A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnoses. *Prenat Diagn.* 4 Spec No:45-67.
- Boue, J., A. Bou, and P. Lazar. 1975. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology.* 12:11-26.
- Branch, D.W., and C. Heuser. 2010. Recurrent Miscarriage. In *Reproductive endocrinology and Infertility*. D.T. Carrell and C. Peterson, editors. Springer, NY. 281-296.
- Brandriff, B., L. Gordon, L. Ashworth, G. Watchmaker, D. Moore, 2nd, A.J. Wyrobek, and A.V. Carrano. 1985. Chromosomes of human sperm: variability among normal individuals. *Hum Genet.* 70:18-24.
- Braude, P., S. Pickering, F. Flinter, and C.M. Ogilvie. 2002. Preimplantation genetic diagnosis. *Nat Rev Genet.* 3:941-53.
- Bressan, F.F., T.H. De Bem, F. Perecin, F.L. Lopes, C.E. Ambrosio, F.V. Meirelles, and M.A. Miglino. 2009. Unearthing the roles of imprinted genes in the placenta. *Placenta.* 30:823-34.
- Bruno, D.L., T. Burgess, H. Ren, S. Nouri, M.D. Pertile, D.I. Francis, F. Norris, B.K. Kenney, J. Schouten, K.H. Andy Choo, and H.R. Slater. 2006. High-throughput analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using an MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for polyploidy. *Am J Med Genet A.* 140:2786-93.
- Bryndorf, T., M. Kirchhoff, H. Rose, J. Maahr, T. Gerdes, R. Karhu, A. Kallioniemi, B. Christensen, C. Lundsteen, and J. Philip. 1995. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am J Hum Genet.* 57:1211-20.
- Byrne, J., D. Warburton, J. Kline, W. Blanc, and Z. Stein. 1985. Morphology of early fetal deaths and their chromosomal characteristics. *Teratology.* 32:297-315.
- Byrne, J.L., and K. Ward. 1994. Genetic factors in recurrent abortion. *Clin Obstet Gynecol.* 37:693-704.
- Carp, H., V. Toder, A. Aviram, M. Daniely, S. Mashlach, and G. Barkai. 2001. Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage. *Fertil Steril.* 75:678-82.
- Carp, H.J. 2008a. Recurrent miscarriage: genetic factors and assessment of the embryo. *Isr Med Assoc J.* 10:229-31.
- Carp, H.J. 2008b. Recurrent Pregnancy Loss Causes, Controversies and Treatment. Taylor & Francis e-Library, UK.
- Carrell, D.T., A.L. Wilcox, L. Lowy, C.M. Peterson, K.P. Jones, L. Erickson, B. Campbell, D.W. Branch, and H.H. Hatasaka. 2003. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol.* 101:1229-35.
- Carrington, B., G. Sacks, and L. Regan. 2005. Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 17:591-7.
- Christiansen, O.B. 2007. Epidemiology of recurrent pregnancy loss. In *Recurrent Pregnancy Loss*. H.J. Carp, editor. Informa Healthcare, UK. 1-13.
- Cirigliano, V., M. Ejarque, M.P. Canadas, E. Lloveras, A. Plaja, M.M. Perez, C. Fuster, and J. Egozcue. 2001. Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common

- chromosome aneuploidies. *Mol Hum Reprod.* 7:1001-6.
- Cirigliano, V., G. Voglino, A. Marongiu, P. Canadas, E. Ordóñez, E. Lloveras, A. Plaza, C. Fuster, and M. Adinolfi. 2006. Rapid prenatal diagnosis by QF-PCR: evaluation of 30,000 consecutive clinical samples and future applications. *Ann N Y Acad Sci.* 1075:288-98.
- Cirio, M.C., J. Martel, M. Mann, M. Toppings, M. Bartolomei, J. Trasler, and J.R. Chaillet. 2008. DNA methyltransferase 1o functions during preimplantation development to preclude a profound level of epigenetic variation. *Dev Biol.* 324:139-50.
- Clark, M.B., M. Janicke, U. Gottesbuhren, T. Kleffmann, M. Legge, E.S. Poole, and W.P. Tate. 2007. Mammalian gene PEG10 expresses two reading frames by high efficiency -1 frameshifting in embryonic-associated tissues. *J Biol Chem.* 282:37359-69.
- Coan, P.M., G.J. Burton, and A.C. Ferguson-Smith. 2005. Imprinted genes in the placenta--a review. *Placenta.* 26 Suppl A:S10-20.
- Constancia, M., E. Angiolini, I. Sandovici, P. Smith, R. Smith, G. Kelsey, W. Dean, A. Ferguson-Smith, C.P. Sibley, W. Reik, and A. Fowden. 2005. Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the Igf2 gene and placental transporter systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:19219-24.
- Constancia, M., M. Hemberger, J. Hughes, W. Dean, A. Ferguson-Smith, R. Fundele, F. Stewart, G. Kelsey, A. Fowden, C. Sibley, and W. Reik. 2002. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature.* 417:945-8.
- Constancia, M., G. Kelsey, and W. Reik. 2004. Resourceful imprinting. *Nature.* 432:53-7.
- Daniely, M., A. Aviram-Goldring, G. Barkai, and B. Goldman. 1998. Detection of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization. *Hum Reprod.* 13:805-9.
- De Braekeleer, M., and T.N. Dao. 1990. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod.* 5:519-28.
- DeChiara, T.M., A. Efstratiadis, and E.J. Robertson. 1990. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature.* 345:78-80.
- Dekel, B., S. Metsuyanin, K.M. Schmidt-Ott, E. Fridman, J. Jacob-Hirsch, A. Simon, J. Pinthus, Y. Mor, J. Barasch, N. Amariglio, Y. Reisner, N. Kaminski, and G. Rechavi. 2006. Multiple imprinted and stemness genes provide a link between normal and tumor progenitor cells of the developing human kidney. *Cancer Res.* 66:6040-9.
- Diaz-Meyer, N., C.D. Day, K. Khatod, E.R. Maher, W. Cooper, W. Reik, C. Junien, G. Graham, E. Algar, V.M. Der Kaloustian, and M.J. Higgins. 2003. Silencing of CDKN1C (p57KIP2) is associated with hypomethylation at KvDMR1 in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet.* 40:797-801.
- Diaz-Meyer, N., Y. Yang, S.N. Sait, E.R. Maher, and M.J. Higgins. 2005. Alternative mechanisms associated with silencing of CDKN1C in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet.* 42:648-55.
- Diego-Alvarez, D., C. Ramos-Corrales, M. Garcia-Hoyos, A. Bustamante-Aragones, D. Cantalapiedra, J. Diaz-Recasens, E. Vallespin-Garcia, C. Ayuso, and I. Lorda-Sanchez. 2006. Double trisomy in spontaneous miscarriages: cytogenetic and molecular approach. *Hum Reprod.* 21:958-66.
- Diego-Alvarez, D., M. Rodriguez de Alba, R. Cardero-Merlo, J. Diaz-Recasens, C. Ayuso, C. Ramos, and I. Lorda-Sanchez. 2007. MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages. *Prenat Diagn.* 27:765-71.
- Diplas, A.I., L. Lambertini, M.J. Lee, R. Sperling, Y.L. Lee, J. Wetmur, and J. Chen. 2009. Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas. *Epigenetics.* 4:235-40.
- Donaghue, C., A. Roberts, K. Mann, and C.M. Ogilvie. 2003. Development and targeted application of a rapid QF-PCR test for sex chromosome imbalance. *Prenat Diagn.* 23:201-10.
- du Manoir, S., E. Schrock, M. Bentz, M.R. Speicher, S. Joos, T. Ried, P. Lichter, and T. Cremer. 1995. Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry.* 19:27-41.
- Dudding, T.E., and J. Attia. 2004. The association between adverse pregnancy outcomes and maternal factor V Leiden genotype: a meta-analysis. *Thromb Haemost.* 91:700-11.
- Empson, M., M. Lassere, J.C. Craig, and J.R. Scott. 2002. Recurrent pregnancy loss with antiphospholipid antibody: a systematic review of therapeutic trials. *Obstet Gynecol.* 99:135-44.
- Engel, E., and C.D. DeLozier-Blanchet. 1991. Uniparental disomy, isodisomy, and imprinting: probable effects in man and strategies for their detection. *Am J Med Genet.* 40:432-9.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Enquobahrie, D.A., M. Meller, K. Rice, B.M. Psaty, D.S. Siscovick, and M.A. Williams. 2008. Differential placental gene expression in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 199:566 e1-11.
- Farra, C., B. Giudicelli, M.C. Pellissier, N. Philip, and C. Piquet. 2000. Fetoplacental chromosomal discrepancy. *Prenat Diagn.* 20:190-3.
- Feinberg, A.P. 1999. Imprinting of a genomic domain of 11p15 and loss of imprinting in cancer: an introduction. *Cancer Res.* 59:1743s-1746s.
- Feinberg, A.P., and B. Tycko. 2004. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* 4:143-53.
- Ferguson-Smith, A.C., B.M. Cattanach, S.C. Barton, C.V. Beechey, and M.A. Surani. 1991. Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7. *Nature.* 351:667-70.
- Ferguson-Smith, A.C., and M.A. Surani. 2001. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science.* 293:1086-9.
- FitzPatrick, D.R., J. Ramsay, N.I. McGill, M. Shade, A.D. Carothers, and N.D. Hastie. 2002. Transcriptome analysis of human autosomal trisomy. *Hum Mol Genet.* 11:3249-56.
- Ford, C.E., K.W. Jones, O.J. Miller, U. Mittwoch, L.S. Penrose, M. Ridler, and A. Shapiro. 1959. The chromosomes in a patient showing both mongolism and the Klinefelter syndrome. *Lancet.* 1:709-10.
- Fowden, A.L. 2003. The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta.* 24:803-12.
- Fowden, A.L., C. Sibley, W. Reik, and M. Constancia. 2006. Imprinted genes, placental development and fetal growth. *Horm Res.* 65 Suppl 3:50-8.
- Frost, J.M., and G.E. Moore. 2010. The importance of imprinting in the human placenta. *PLoS Genet.* 6:e1001015.
- Garcia-Enguidanos, A., M.E. Calle, J. Valero, S. Luna, and V. Dominguez-Rojas. 2002. Risk factors in miscarriage: a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 102:111-9.
- Gardner, R., and G. Sutherland. 2004. Chromosome Abnormalities and Genetic counseling. Oxford university Press, NY.
- Garry, V.F., M. Harkins, A. Lyubimov, L. Erickson, and L. Long. 2002. Reproductive outcomes in the women of the Red River Valley of the north. I. The spouses of pesticide applicators: pregnancy loss, age at menarche, and exposures to pesticides. *J Toxicol Environ Health A.* 65:769-86.
- Goddijn, M., J.H. Joosten, A.C. Knegt, F. van der Veen, M.T. Franssen, G.J. Bonsel, and N.J. Leschot. 2004. Clinical relevance of diagnosing structural chromosome abnormalities in couples with repeated miscarriage. *Hum Reprod.* 19:1013-7.
- Goddijn, M., and N.J. Leschot. 2000. Genetic aspects of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 14:855-65.
- Goldenberg, R.L., and C. Thompson. 2003. The infectious origins of stillbirth. *Am J Obstet Gynecol.* 189:861-73.
- Hahnemann, J.M., and L.O. Vejerslev. 1997. Accuracy of cytogenetic findings on chorionic villus sampling (CVS)--diagnostic consequences of CVS mosaicism and non-mosaic discrepancy in centres contributing to EUCROMIC 1986-1992. *Prenat Diagn.* 17:801-20.
- Hamilton, G.S., J.J. Lysiak, V.K. Han, and P.K. Lala. 1998. Autocrine-paracrine regulation of human trophoblast invasiveness by insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein (IGFBP)-1. *Exp Cell Res.* 244:147-56.
- Hassold, T., and D. Chiu. 1985. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet.* 70:11-7.
- Hassold, T., H. Hall, and P. Hunt. 2007. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet.* 16 Spec No. 2:R203-8.
- Hassold, T., and P. Hunt. 2001. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet.* 2:280-91.
- Hassold, T., M. Merrill, K. Adkins, S. Freeman, and S. Sherman. 1995. Recombination and maternal age-dependent nondisjunction: molecular studies of trisomy 16. *Am J Hum Genet.* 57:867-74.
- Hatada, I., and T. Mukai. 1995. Genomic imprinting of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in mouse. *Nat Genet.* 11:204-6.
- Hay, P.E. 2004. Bacterial vaginosis and miscarriage. *Curr Opin Infect Dis.* 17:41-4.
- Hay, P.E., R.F. Lamont, D. Taylor-Robinson, D.J. Morgan, C. Ison, and J. Pearson. 1994. Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage. *BMJ.* 308:295-8.
- Hedborg, F., L. Holmgren, B. Sandstedt, and R. Ohlsson. 1994. The cell type-specific IGF2 expression during early human development correlates to the pattern of overgrowth and neoplasia in the Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Pathol.* 145:802-17.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hemberger, M., and J.C. Cross. 2001. Genes governing placental development. *Trends Endocrinol Metab.* 12:162-8.
- Henriksen, T.B., N.H. Hjollund, T.K. Jensen, J.P. Bonde, A.M. Andersson, H. Kolstad, E. Ernst, A. Giwercman, N.E. Skakkebaek, and J. Olsen. 2004. Alcohol consumption at the time of conception and spontaneous abortion. *Am J Epidemiol.* 160:661-7.
- Hirasawa, R., H. Chiba, M. Kaneda, S. Tajima, E. Li, R. Jaenisch, and H. Sasaki. 2008. Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes Dev.* 22:1607-16.
- Hogge, W.A., T.L. Prosen, M.C. Lanasa, H.A. Huber, and M.F. Reeves. 2007. Recurrent spontaneous abortion and skewed X-inactivation: is there an association? *Am J Obstet Gynecol.* 196:384 e1-6; discussion 384 e6-8.
- Illingworth, R.S., and A.P. Bird. 2009. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett.* 583:1713-20.
- Ip, W.K., P.B. Lai, N.L. Wong, S.M. Sy, B. Beheshti, J.A. Squire, and N. Wong. 2007. Identification of PEG10 as a progression related biomarker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 250:284-91.
- Jarrett, K.L., R.C. Michaelis, M.C. Phelan, V.A. Vincent, and R.G. Best. 2001. Microsatellite analysis reveals a high incidence of maternal cell contamination in 46,XX products of conception consisting of villi or a combination of villi and membranous material. *Am J Obstet Gynecol.* 185:198-203.
- Jaslow, C.R., J.L. Carney, and W.H. Kutteh. 2010. Diagnostic factors identified in 1020 women with two versus three or more recurrent pregnancy losses. *Fertil Steril.* 93:1234-43.
- Jones, P.A., and D. Takai. 2001. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science.* 293:1068-70.
- Kallioniemi, A., O.P. Kallioniemi, D. Sudar, D. Rutovitz, J.W. Gray, F. Waldman, and D. Pinkel. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 258:818-21.
- Kalousek, D.K., I.J. Barrett, and A.B. Gartner. 1992. Spontaneous abortion and confined chromosomal mosaicism. *Hum Genet.* 88:642-6.
- Kalousek, D.K., I.J. Barrett, and B.C. McGillivray. 1989. Placental mosaicism and intrauterine survival of trisomies 13 and 18. *Am J Hum Genet.* 44:338-43.
- Kalousek, D.K., P.N. Howard-Peebles, S.B. Olson, I.J. Barrett, A. Dorfmann, S.H. Black, J.D. Schulman, and R.D. Wilson. 1991. Confirmation of CVS mosaicism in term placentae and high frequency of intrauterine growth retardation association with confined placental mosaicism. *Prenat Diagn.* 11:743-50.
- Kalousek, D.K., T. Pantzar, M. Tsai, and B. Paradise. 1993. Early spontaneous abortion: morphologic and karyotypic findings in 3,912 cases. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 29:53-61.
- Kalousek, D.K., and M. Vekemans. 1996. Confined placental mosaicism. *J Med Genet.* 33:529-33.
- Kalousek, D.K., and M. Vekemans. 2000. Confined placental mosaicism and genomic imprinting. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 14:723-30.
- Karaoguz, M.Y., T. Nas, E. Konac, D. Ince, E. Pala, and S. Menevse. 2005. Is cytogenetic diagnosis of 46,XX karyotype spontaneous abortion specimens erroneous? Fluorescence in situ hybridization as a confirmatory technique. *J Obstet Gynaecol Res.* 31:508-13.
- Karaoguz, M.Y., E.F. Percin, E. Pala, A.A. Biri, and U. Korucuoglu. 2010. SRY gene amplifications and genotypings revealed the occurrence of the hidden maternal decidual cells in 46,XX karyotyped spontaneous abortions. *Genet Couns.* 21:9-17.
- Kimura, A.P., S.A. Liebhaber, and N.E. Cooke. 2004. Epigenetic modifications at the human growth hormone locus predict distinct roles for histone acetylation and methylation in placental gene activation. *Mol Endocrinol.* 18:1018-32.
- Klose, R.J., and A.P. Bird. 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci.* 31:89-97.
- Knox, K.S., and J.C. Baker. 2007. Genome-wide expression profiling of placentas in the p57Kip2 model of pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.* 13:251-63.
- Koopman, L.A., H.D. Kopcow, B. Rybalov, J.E. Boyson, J.S. Orange, F. Schatz, R. Masch, C.J. Lockwood, A.D. Schachter, P.J. Park, and J.L. Strominger. 2003. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med.* 198:1201-12.
- Kotzot, D. 1999. Abnormal phenotypes in uniparental disomy (UPD): fundamental aspects and a critical

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- review with bibliography of UPD other than 15. *Am J Med Genet.* 82:265-74.
- Kovalevsky, G., C.R. Gracia, J.A. Berlin, M.D. Sammel, and K.T. Barnhart. 2004. Evaluation of the association between hereditary thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Arch Intern Med.* 164:558-63.
- Krabbendam, I., A. Franx, M.L. Bots, R. Fijnheer, and H.W. Bruinse. 2005. Thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a critical appraisal of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 118:143-53.
- Lachapelle, M.H., P. Miron, R. Hemmings, and D.C. Roy. 1996. Endometrial T, B, and NK cells in patients with recurrent spontaneous abortion. Altered profile and pregnancy outcome. *J Immunol.* 156:4027-34.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel, and T. Tuschl. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 294:853-8.
- Lanasa, M.C., W.A. Hogge, C. Kubik, J. Blancato, and E.P. Hoffman. 1999. Highly skewed X-chromosome inactivation is associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Am J Hum Genet.* 65:252-4.
- Larsen, F., G. Gundersen, R. Lopez, and H. Prydz. 1992. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics.* 13:1095-107.
- Ledbetter, D.H., J.M. Zachary, J.L. Simpson, M.S. Golbus, E. Pergament, L. Jackson, M.J. Mahoney, R.J. Desnick, J. Schulman, K.L. Copeland, and et al. 1992. Cytogenetic results from the U.S. Collaborative Study on CVS. *Prenat Diagn.* 12:317-45.
- Lee, M.H., I. Reynisdottir, and J. Massague. 1995. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.* 9:639-49.
- Lee, M.H., H.M. Ryu, D.J. Kim, B.Y. Lee, E.H. Cho, J.H. Yang, M.Y. Kim, J.Y. Han, and S.Y. Park. 2004. Rapid prenatal diagnosis of Down Syndrome using quantitative fluorescent PCR in uncultured amniocytes. *J Korean Med Sci.* 19:341-4.
- Lefebvre, L., S. Viville, S.C. Barton, F. Ishino, E.B. Keverne, and M.A. Surani. 1998. Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene Mest. *Nat Genet.* 20:163-9.
- Lejeune, J., R. Turpin, and M. Gautier. 1959. [Chromosomal diagnosis of mongolism.]. *Arch Fr Pediatr.* 16:962-3.
- Lewis, A., K. Mitsuya, D. Umlauf, P. Smith, W. Dean, J. Walter, M. Higgins, R. Feil, and W. Reik. 2004. Imprinting on distal chromosome 7 in the placenta involves repressive histone methylation independent of DNA methylation. *Nat Genet.* 36:1291-5.
- Li, C.M., A.A. Margolin, M. Salas, L. Memeo, M. Mansukhani, H. Hibshoosh, M. Szabolcs, A. Klinakis, and B. Tycko. 2006. PEG10 is a c-MYC target gene in cancer cells. *Cancer Res.* 66:665-72.
- Li, D.K., T. Janevic, R. Odouli, and L. Liu. 2003. Hot tub use during pregnancy and the risk of miscarriage. *Am J Epidemiol.* 158:931-7.
- Li, D.K., R. Odouli, S. Wi, T. Janevic, I. Golditch, T.D. Bracken, R. Senior, R. Rankin, and R. Iriye. 2002. A population-based prospective cohort study of personal exposure to magnetic fields during pregnancy and the risk of miscarriage. *Epidemiology.* 13:9-20.
- Li, E. 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 3:662-73.
- Lighten, A.D., K. Hardy, R.M. Winston, and G.E. Moore. 1997. Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 47:134-9.
- Lin, P.C. 2004. Reproductive outcomes in women with uterine anomalies. *J Womens Health (Larchmt).* 13:33-9.
- Lomax, B., S. Tang, E. Separovic, D. Phillips, E. Hillard, T. Thomson, and D.K. Kalousek. 2000. Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions. *Am J Hum Genet.* 66:1516-21.
- Lucifero, D., M.R. Mann, M.S. Bartolomei, and J.M. Trasler. 2004. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet.* 13:839-49.
- Luedi, P.P., F.S. Dietrich, J.R. Weidman, J.M. Bosko, R.L. Jirtle, and A.J. Hartemink. 2007. Computational and experimental identification of novel human imprinted genes. *Genome Res.* 17:1723-30.
- Luisi, S., L. Lazzeri, and A.R. Genazzani. 2007. Endocrinology of pregnancy loss. In *Recurrent Pregnancy Loss*. I. Healthcare, editor, UK. 79-87.
- Lux, H., H. Flammann, M. Hafner, and A. Lux. 2010. Genetic and molecular analyses of PEG10 reveal

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- new aspects of genomic organization, transcription and translation. *PLoS One*. 5:e8686.
- Maccani, M.A., and C.J. Marsit. 2009. Epigenetics in the placenta. *Am J Reprod Immunol*. 62:78-89.
- Mansfield, E.S. 1993. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum Mol Genet*. 2:43-50.
- McFadden, D.E., and D.K. Kalousek. 1989. Survey of neural tube defects in spontaneously aborted embryos. *Am J Med Genet*. 32:356-8.
- McFadden, D.E., L.C. Kwong, I.Y. Yam, and S. Langlois. 1993. Parental origin of triploidy in human fetuses: evidence for genomic imprinting. *Hum Genet*. 92:465-9.
- McFadden, D.E., and S. Langlois. 2000. Parental and meiotic origin of triploidy in the embryonic and fetal periods. *Clin Genet*. 58:192-200.
- McFadden, D.E., and W.P. Robinson. 2006. Phenotype of triploid embryos. *J Med Genet*. 43:609-12.
- McGrath, J., and D. Solter. 1984. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*. 37:179-83.
- McMinn, J., M. Wei, Y. Sadovsky, H.M. Thaker, and B. Tycko. 2006a. Imprinting of PEG1/MEST isoform 2 in human placenta. *Placenta*. 27:119-26.
- McMinn, J., M. Wei, N. Schupf, J. Cusmai, E.B. Johnson, A.C. Smith, R. Weksberg, H.M. Thaker, and B. Tycko. 2006b. Unbalanced placental expression of imprinted genes in human intrauterine growth restriction. *Placenta*. 27:540-9.
- Menasha, J., B. Levy, K. Hirschhorn, and N.B. Kardon. 2005. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from a 12-year study. *Genet Med*. 7:251-63.
- Meyer, R.E., T.E. Aldrich, and C.E. Easterly. 1989. Effects of noise and electromagnetic fields on reproductive outcomes. *Environ Health Perspect*. 81:193-200.
- Micale, M., J. Insko, S.A. Ebrahim, A. Adeyinka, C. Runke, and D.L. Van Dyke. 2010. Double trisomy revisited--a multicenter experience. *Prenat Diagn*. 30:173-6.
- Michels, T.C., and A.Y. Tiu. 2007. Second trimester pregnancy loss. *Am Fam Physician*. 76:1341-6.
- Milton, A.H., W. Smith, B. Rahman, Z. Hasan, U. Kulsum, K. Dear, M. Rakibuddin, and A. Ali. 2005. Chronic arsenic exposure and adverse pregnancy outcomes in bangladesh. *Epidemiology*. 16:82-6.
- Miozzo, M., and G. Simoni. 2002. The role of imprinted genes in fetal growth. *Biol Neonate*. 81:217-28.
- Mocellin, S., S. Pasquali, and P. Pilati. 2009. Oncomirs: from tumor biology to molecularly targeted anticancer strategies. *Mini Rev Med Chem*. 9:70-80.
- Monk, D., P. Arnaud, S. Apostolidou, F.A. Hills, G. Kelsey, P. Stanier, R. Feil, and G.E. Moore. 2006. Limited evolutionary conservation of imprinting in the human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:6623-8.
- Morgan, H.D., F. Santos, K. Green, W. Dean, and W. Reik. 2005. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet*. 14 Spec No 1:R47-58.
- Morssink, L.P., J.G. Santema, and F. Willemse. 2004. Thrombophilia is not associated with an increase in placental abnormalities in women with intra-uterine fetal death. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 83:348-50.
- Munne, S., M. Sandalinas, C. Magli, L. Gianaroli, J. Cohen, and D. Warburton. 2004. Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions. *Prenat Diagn*. 24:638-43.
- Nafee, T.M., W.E. Farrell, W.D. Carroll, A.A. Fryer, and K.M. Ismail. 2008. Epigenetic control of fetal gene expression. *BJOG*. 115:158-68.
- Nielsen, A., C.G. Hannibal, B.E. Lindekilde, J. Tolstrup, K. Frederiksen, C. Munk, T. Bergholt, L. Buss, B. Ottesen, M. Gronbaek, and S.K. Kjaer. 2006. Maternal smoking predicts the risk of spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 85:1057-65.
- Ogasawara, M., K. Aoki, S. Okada, and K. Suzumori. 2000. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil Steril*. 73:300-4.
- Ohgane, J., S. Yagi, and K. Shiota. 2008. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. *Placenta*. 29 Suppl A:S29-35.
- Ohlsson, R., L. Holmgren, A. Glaser, A. Szpecht, and S. Pfeifer-Ohlsson. 1989. Insulin-like growth factor 2 and short-range stimulatory loops in control of human placental growth. *EMBO J*. 8:1993-9.
- Okabe, H., S. Satoh, Y. Furukawa, T. Kato, S. Hasegawa, Y. Nakajima, Y. Yamaoka, and Y. Nakamura. 2003. Involvement of PEG10 in human hepatocellular carcinogenesis through interaction with SIAH1. *Cancer Res*. 63:3043-8.
- Ono, R., S. Kobayashi, H. Wagatsuma, K. Aisaka, T. Kohda, T. Kaneko-Ishino, and F. Ishino. 2001. A retrotransposon-derived gene, PEG10, is a novel

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- imprinted gene located on human chromosome 7q21. *Genomics*. 73:232-7.
- Ono, R., K. Nakamura, K. Inoue, M. Naruse, T. Usami, N. Wakisaka-Saito, T. Hino, R. Suzuki-Migishima, N. Ogonuki, H. Miki, T. Kohda, A. Ogura, M. Yokoyama, T. Kaneko-Ishino, and F. Ishino. 2006. Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nat Genet*. 38:101-6.
- Ono, R., H. Shiura, H. Aburatani, T. Kohda, T. Kaneko-Ishino, and F. Ishino. 2003. Identification of a large novel imprinted gene cluster on mouse proximal chromosome 6. *Genome Res*. 13:1696-705.
- Onyango, P., W. Miller, J. Lehoczy, C.T. Leung, B. Birren, S. Wheelan, K. Dewar, and A.P. Feinberg. 2000. Sequence and comparative analysis of the mouse 1-megabase region orthologous to the human 11p15 imprinted domain. *Genome Res*. 10:1697-710.
- Ostojic, S., N. Perez, M. Volk, M. Kapovic, and B. Peterlin. 2008. Genetic predisposition to idiopathic recurrent spontaneous abortion: contribution of genetic variations in IGF-2 and H19 imprinted genes. *Am J Reprod Immunol*. 60:111-7.
- Park, C.G., S.Y. Lee, G. Kandala, and Y. Choi. 1996. A novel gene product that couples TCR signaling to Fas(CD95) expression in activation-induced cell death. *Immunity*. 4:583-91.
- Pasquier, E., C. Bohec, L. De Saint Martin, C. Le Marechal, M.T. Le Martelot, S. Roche, Y. Laurent, C. Ferec, M. Collet, and D. Mottier. 2007. Strong evidence that skewed X-chromosome inactivation is not associated with recurrent pregnancy loss: an incident paired case control study. *Hum Reprod*. 22:2829-33.
- Pegoraro, E., J. Whitaker, P. Mowery-Rushton, U. Surti, M. Lanasa, and E.P. Hoffman. 1997. Familial skewed X inactivation: a molecular trait associated with high spontaneous-abortion rate maps to Xq28. *Am J Hum Genet*. 61:160-70.
- Pflueger, S. 2005. Cytogenetics of Spontaneous Abortion. In *The Principles of Clinical Cytogenetics*. S. Gersen and M. Keagle, editors. Humana Press, New Jersey. 323-345.
- Philipp, T., K. Philipp, A. Reiner, F. Beer, and D.K. Kalousek. 2003. Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. *Hum Reprod*. 18:1724-32.
- Plushch, G., E. Schneider, D. Weise, N. El Hajj, A. Tresch, L. Seidmann, W. Coerd, A.M. Muller, U. Zechner, and T. Haaf. 2010. Extreme Methylation Values of Imprinted Genes in Human Abortions and Stillbirths. *Am J Pathol*. 176:1084-90.
- Qian, N., D. Frank, D. O'Keefe, D. Dao, L. Zhao, L. Yuan, Q. Wang, M. Keating, C. Walsh, and B. Tycko. 1997. The IPL gene on chromosome 11p15.5 is imprinted in humans and mice and is similar to TDAG51, implicated in Fas expression and apoptosis. *Hum Mol Genet*. 6:2021-9.
- Quenby, S., M. Bates, T. Doig, J. Brewster, D.I. Lewis-Jones, P.M. Johnson, and G. Vince. 1999. Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 14:2386-91.
- Qumsiyeh, M.B. 1998. Chromosome abnormalities in the placenta and spontaneous abortions. *J Matern Fetal Med*. 7:210-2.
- Rai, R., M. Backos, S. Elgaddal, A. Shlebak, and L. Regan. 2002. Factor V Leiden and recurrent miscarriage-prospective outcome of untreated pregnancies. *Hum Reprod*. 17:442-5.
- Rai, R., and L. Regan. 2006. Recurrent miscarriage. *Lancet*. 368:601-11.
- Rai, R.S., L. Regan, K. Clifford, W. Pickering, M. Dave, I. Mackie, T. McNally, and H. Cohen. 1995. Antiphospholipid antibodies and beta 2-glycoprotein-I in 500 women with recurrent miscarriage: results of a comprehensive screening approach. *Hum Reprod*. 10:2001-5.
- Ralph, S.G., A.J. Rutherford, and J.D. Wilson. 1999. Influence of bacterial vaginosis on conception and miscarriage in the first trimester: cohort study. *BMJ*. 319:220-3.
- Reik, W., M. Constancia, A. Fowden, N. Anderson, W. Dean, A. Ferguson-Smith, B. Tycko, and C. Sibley. 2003. Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes. *J Physiol*. 547:35-44.
- Reik, W., W. Dean, and J. Walter. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 293:1089-93.
- Reik, W., and A. Lewis. 2005. Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. *Nat Rev Genet*. 6:403-10.
- Revich, B., E. Aksel, T. Ushakova, I. Ivanova, N. Zhuchenko, N. Klyuev, B. Brodsky, and Y. Sotskov. 2001. Dioxin exposure and public health in Chapaevsk, Russia. *Chemosphere*. 43:951-66.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rey, E., S.R. Kahn, M. David, and I. Shrier. 2003. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet*. 361:901-8.
- Rice, J.C., and C.D. Allis. 2001. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 13:263-73.
- Robinson, W.P., D.E. McFadden, and M.D. Stephenson. 2001. The origin of abnormalities in recurrent aneuploidy/polyploidy. *Am J Hum Genet*. 69:1245-54.
- Romanelli, V., A. Belinchon, A. Campos-Barros, K.E. Heath, S. Garcia-Minaur, V. Martinez-Glez, R. Palomo, G. Mercado, R. Gracia, and P. Lapunzina. 2009. CDKN1C mutations in HELLP/preeclamptic mothers of Beckwith-Wiedemann Syndrome (BWS) patients. *Placenta*. 30:551-4.
- Rubio, C., C. Simon, F. Vidal, L. Rodrigo, T. Pehlivan, J. Remohi, and A. Pellicer. 2003. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod*. 18:182-8.
- Salas, M., R. John, A. Saxena, S. Barton, D. Frank, G. Fitzpatrick, M.J. Higgins, and B. Tycko. 2004. Placental growth retardation due to loss of imprinting of Phlda2. *Mech Dev*. 121:1199-210.
- Santos, F., B. Hendrich, W. Reik, and W. Dean. 2002. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol*. 241:172-82.
- Saxena, A., D. Frank, P. Panichkul, I.B. Van den Veyver, B. Tycko, and H. Thaker. 2003. The product of the imprinted gene IPL marks human villous cytotrophoblast and is lost in complete hydatidiform mole. *Placenta*. 24:835-42.
- Schaeffer, A.J., J. Chung, K. Heretis, A. Wong, D.H. Ledbetter, and C. Lese Martin. 2004. Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. *Am J Hum Genet*. 74:1168-74.
- Schwienbacher, C., A. Angioni, R. Scelfo, A. Veronese, G.A. Calin, G. Massazza, I. Hatada, G. Barbanti-Brodano, and M. Negrini. 2000. Abnormal RNA expression of 11p15 imprinted genes and kidney developmental genes in Wilms' tumor. *Cancer Res*. 60:1521-5.
- Sharma, A., P. Paliwal, V. Dadhwal, Y. Sharma, and D. Deka. 2009. Rare finding of 2n/4n mixoploidy in mother and fetus with severe immune hydrops. *Cytogenet Genome Res*. 124:90-3.
- Sherman, S.L., N.E. Lamb, and E. Feingold. 2006. Relationship of recombination patterns and maternal age among non-disjoined chromosomes 21. *Biochem Soc Trans*. 34:578-80.
- Shin, J.C., J.H. Lee, D.E. Yang, H.B. Moon, J.G. Rha, and S.P. Kim. 2003. Expression of insulin-like growth factor-II and insulin-like growth factor binding protein-1 in the placental basal plate from pre-eclamptic pregnancies. *Int J Gynaecol Obstet*. 81:273-80.
- Signorello, L.B., and J.K. McLaughlin. 2004. Maternal caffeine consumption and spontaneous abortion: a review of the epidemiologic evidence. *Epidemiology*. 15:229-39.
- Sikkema, J.M., A. Franx, H.W. Bruinse, N.G. van der Wijk, H.W. de Valk, and P.G. Nikkels. 2002. Placental pathology in early onset pre-eclampsia and intra-uterine growth restriction in women with and without thrombophilia. *Placenta*. 23:337-42.
- Simpson, J. 2007. Genetics of spontaneous abortions. In *Recurrent Pregnancy Loss*. H.J. Carp, editor. Informa Healthcare, UK. 23-34.
- Simpson, J.L., and A. Bombard. 1987. Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion: frequency pathology and genetic counselling. In *Spontaneous and Recurrent Abortion*. M.E. DK, editor. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 51-76.
- Simpson, J.L., S. Elias, and A.O. Martin. 1981. Parental chromosomal rearrangements associated with repetitive spontaneous abortions. *Fertil Steril*. 36:584-90.
- Smith, A.C., S. Choufani, J.C. Ferreira, and R. Weksberg. 2007. Growth regulation, imprinted genes, and chromosome 11p15.5. *Pediatr Res*. 61:43R-47R.
- Smith, K., G. Lowther, E. Maher, T. Hourihan, T. Wilkinson, and J. Wolstenholme. 1999. The predictive value of findings of the common aneuploidies, trisomies 13, 18 and 21, and numerical sex chromosome abnormalities at CVS: experience from the ACC U.K. Collaborative Study. Association of Clinical Cytogeneticists Prenatal Diagnosis Working Party. *Prenat Diagn*. 19:817-26.
- Stephenson, M., and W. Kutteh. 2007. Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol*. 50:132-45.
- Stephenson, M.D., K.A. Awartani, and W.P. Robinson. 2002. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod*. 17:446-51.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Stern, C., L. Chamley, L. Hale, M. Kloss, A. Speirs, and H.W. Baker. 1998. Antibodies to beta2 glycoprotein I are associated with in vitro fertilization implantation failure as well as recurrent miscarriage: results of a prevalence study. *Fertil Steril*. 70:938-44.
- Stetten, G., C.S. Escallon, S.T. South, J.L. McMichael, D.O. Saul, and K.J. Blakemore. 2004. Reevaluating confined placental mosaicism. *Am J Med Genet A*. 131:232-9.
- Strahl, B.D., and C.D. Allis. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403:41-5.
- Sugiura-Ogasawara, M., Y. Ozaki, T. Sato, N. Suzumori, and K. Suzumori. 2004. Poor prognosis of recurrent aborters with either maternal or paternal reciprocal translocations. *Fertil Steril*. 81:367-73.
- Sullivan, A.E., T. Lewis, M. Stephenson, R. Odem, J. Schreiber, C. Ober, and D.W. Branch. 2003. Pregnancy outcome in recurrent miscarriage patients with skewed X chromosome inactivation. *Obstet Gynecol*. 101:1236-42.
- Surani, M.A. 2001. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature*. 414:122-8.
- Surani, M.A., S.C. Barton, and M.L. Norris. 1984. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*. 308:548-50.
- Suthers, G. 1996. Mutations, malformations and mortality. *J Paediatr Child Health*. 32:10-5.
- Suzuki, S., M.B. Renfree, A.J. Pask, G. Shaw, S. Kobayashi, T. Kohda, T. Kaneko-Ishino, and F. Ishino. 2005. Genomic imprinting of IGF2, p57(KIP2) and PEG1/MEST in a marsupial, the tammar wallaby. *Mech Dev*. 122:213-22.
- Takahashi, K., and K. Nakayama. 2000. Mice lacking a CDK inhibitor, p57Kip2, exhibit skeletal abnormalities and growth retardation. *J Biochem*. 127:73-83.
- Tremblay, K.D., J.R. Saam, R.S. Ingram, S.M. Tilghman, and M.S. Bartolomei. 1995. A paternal-specific methylation imprint marks the alleles of the mouse H19 gene. *Nat Genet*. 9:407-13.
- Tsou, A.P., Y.C. Chuang, J.Y. Su, C.W. Yang, Y.L. Liao, W.K. Liu, J.H. Chiu, and C.K. Chou. 2003. Overexpression of a novel imprinted gene, PEG10, in human hepatocellular carcinoma and in regenerating mouse livers. *J Biomed Sci*. 10:625-35.
- Tunster, S.J., B. Tycko, and R.M. John. 2010. The imprinted Phlda2 gene regulates extraembryonic energy stores. *Mol Cell Biol*. 30:295-306.
- Twig, G., Y. sherer, M. Blank, and Y. Shoenfeld. 2007. Antiphospholipid syndrome pathophysiology. In Recurrent Pregnancy Loss. H.J. Carp, editor. Informa Healthcare, UK. 107-118.
- Vambergue, A., I. Fajardy, P. Dufour, A.S. Valat, M. Vandersippe, P. Fontaine, P.M. Danze, and J. Rousseaux. 2007. No loss of genomic imprinting of IGF-II and H19 in placentas of diabetic pregnancies with fetal macrosomia. *Growth Horm IGF Res*. 17:130-6.
- van den Boogaard, E., S.P. Kaandorp, M.T. Franssen, B.W. Mol, N.J. Leschot, C.H. Wouters, F. van der Veen, J.C. Korevaar, and M. Goddijn. 2010. Consecutive or non-consecutive recurrent miscarriage: is there any difference in carrier status? *Hum Reprod*. 25:1411-4.
- van Rooij, E., L.B. Sutherland, X. Qi, J.A. Richardson, J. Hill, and E.N. Olson. 2007. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 316:575-9.
- Volff, J., C. Korting, and M. Scharl. 2001. Ty3/Gypsy retrotransposon fossils in mammalian genomes: did they evolve into new cellular functions? *Mol Biol Evol*. 18:266-70.
- Wagschal, A., and R. Feil. 2006. Genomic imprinting in the placenta. *Cytogenet Genome Res*. 113:90-8.
- Wapner, R.J., and D. Lewis. 2002. Genetics and metabolic causes of stillbirth. *Semin Perinatol*. 26:70-4.
- Warburton, D., J. Kline, Z. Stein, M. Hutzler, A. Chin, and T. Hassold. 1987. Does the karyotype of a spontaneous abortion predict the karyotype of a subsequent abortion? Evidence from 273 women with two karyotyped spontaneous abortions. *Am J Hum Genet*. 41:465-83.
- Warren, J.E., and R.M. Silver. 2008. Genetics of pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol*. 51:84-95.
- Watson, E.D., and J.C. Cross. 2005. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology (Bethesda)*. 20:180-93.
- Weaver, J.R., M. Susiarjo, and M.S. Bartolomei. 2009. Imprinting and epigenetic changes in the early embryo. *Mamm Genome*. 20:532-43.
- Weinhold, B. 2006. Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect*. 114:A160-7.
- Weksberg, R., C. Shuman, and A.C. Smith. 2005. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 137C:12-23.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Weselak, M., T.E. Arbuckle, M.C. Walker, and D. Krewski. 2008. The influence of the environment and other exogenous agents on spontaneous abortion risk. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 11:221-41.
- Woelfer, B., R. Salim, S. Banerjee, J. Elson, L. Regan, and D. Jurkovic. 2001. Reproductive outcomes in women with congenital uterine anomalies detected by three-dimensional ultrasound screening. *Obstet Gynecol.* 98:1099-103.
- Yang, C.J., P. Stone, and A.W. Stewart. 2006. The epidemiology of recurrent miscarriage: a descriptive study of 1214 prepregnant women with recurrent miscarriage. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 46:316-22.
- Yokomine, T., H. Shirohzu, W. Purbowasito, A. Toyoda, H. Iwama, K. Ikeo, T. Hori, S. Mizuno, M. Tsudzuki, Y. Matsuda, M. Hattori, Y. Sakaki, and H. Sasaki. 2005. Structural and functional analysis of a 0.5-Mb chicken region orthologous to the imprinted mammalian *Ascl2/Mash2-Igf2-H19* region. *Genome Res.* 15:154-65.
- Zaragoza, M.V., U. Surti, R.W. Redline, E. Millie, A. Chakravarti, and T.J. Hassold. 2000. Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole. *Am J Hum Genet.* 66:1807-20.
- Zhang, Y., and D. Reinberg. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15:2343-60.

