

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/40503
IB/81486



UNICAMP

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

OL 4
e

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Gloria Maria Gelle de Oliveira

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM
UMA AMOSTRA DE ÓBITOS
PERINATAIS**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia para ob
tenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas na
área de Genética Humana
e Médica.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Denise Pontes Cavalcanti

1999



UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	OL4e
V.	Ex
T. AMB. B.	40503
PROC.	278/00
C	☐
D	☒
PREÇO	311,00
DATA	14/03/00
N.º CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

CM-00135072-0

OL4e

Oliveira, Glória Maria Gelle de
Estudo citogenético em uma amostra de óbitos perinatais/
Glória Maria Gelle de oliveira. – campinas, SP, [s.n.], 1999.

Orientador : Denise Pontes Cavalcanti.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Mortalidade perinatal. 2. Cromossomos – Aberrações.
3. Tecidos (Anatomia e fisiologia) – Cultura e meios de cul-
tura. 4. Feto – Anomalias. 5. Citogenética humana.
I. Cavalcanti, Denise Pontes. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

11596

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Gloria Maria Gelle de Oliveira

ESTUDO CITOGENÉTICO EM UMA AMOSTRA
DE ÓBITOS PERINATAIS

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
<i>Gloria maria Gelle de Oliveira</i>
e aprovada pela Comissão Julgadora.
<i>16/12/99</i>

Tese apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do título de
Mestre em Genética e
Biologia Molecular na
área de Genética
Humana e Médica

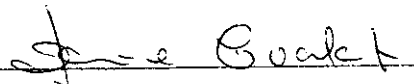
Denise Pontes Cavalcanti
Orientador: Profa. Dra. Denise Pontes Cavalcanti

Data da Defesa: 16/12/99

Banca Examinadora

Titulares:

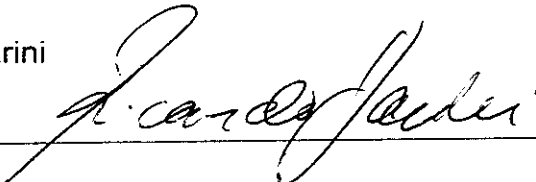
Profª. Drª. Denise Pontes Cavalcanti

_____

Profª. Drª. Christine Hackel

_____

Prof. Dr. Ricardo Barini

_____

Suplente:

Profª. Drª. Albina Messias de Almeida Milani Altemani

*“Que pode uma criatura senão,
entre criaturas, amar ?...”*

Carlos Drummond de Andrade

A

*meus pais, Nestor e Floripes, por
terem proporcionado, com sacrifício,
as bases da minha formação;*

Dereir Pedro, meu esposo;

Myrna,

Mara,

Pedro e

João, meus filhos.

*“Se não houver frutos,
Valeu a beleza das flores;
Se não houver flores,
Valeu a sombra das folhas;
Se não houver folhas,
Valeu a intenção da semente”*

M. Gandhi

*À Prof^a. Dr^a. Denise Pontes Cavalcanti,
meus agradecimentos especiais.*

Ao LABORATÓRIO de PROCEDIMENTOS ESPECIALIZADOS do CAISM-UNICAMP, na pessoa de sua coordenadora, Prof^a. Dr^a. Fátima Bötcher Luiz e funcionários, pelo apoio técnico e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Tânia Regina Carillo e Nilma Lúcia Viguetti, pelo apoio técnico e amizade.

Aos Professores Dr. Antônio Sérgio Ramalho, Dr^a. Christine Hackel, Dr^a. Fátima Bötcher Luiz pela análise prévia deste trabalho e sugestões apresentadas.

Aos colegas e funcionários do LABORATÓRIO DE CITOGENÉTICA do DEPARTAMENTO de GENÉTICA da FACULDADE de CIÊNCIAS MÉDICAS da UNICAMP, pelo apoio e colaboração prestados.

A todos que, embora não nomeados, colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, a minha sincera gratidão.

SUMÁRIO

	PG
1 – INTRODUÇÃO	01
2 – ANTECEDENTES NA LITERATURA	05
2.1 – Anomalias Cromossômicas.....	08
2.1.1 – Definições e mecanismos das anomalias cromossômicas.....	09
2.1.2 – Principais anomalias cromossômicas numéricas.....	10
2.1.3 – Anomalias cromossômicas estruturais.....	14
2.1.4 – Dissomia uniparental.....	15
2.2 – Frequência de aberrações cromossômicas nas perdas gestacionais.....	16
2.3 – Avaliação dos estudos citogenéticos em óbitos perinatais e seus resultados com uso de diferentes técnicas de cultivo celular.....	21
2.4 – Utilização de técnicas moleculares no estudo citogenético dos óbitos perinatais.....	22
3 – OBJETIVOS	25
4 – CASUÍSTICA E MÉTODOS	27
4.1 – Coleta de dados clínicos.....	28
4.2 – Coleta de material biológico.....	28
4.3 – Estudos citogenéticos.....	29
4.3.1 – Técnica de obtenção de metáfases a partir do cultivo de linfócitos de sangue periférico.....	29
4.3.2 – Técnica para obtenção de metáfases a partir do cultivo celular de fibroblastos de pele pelo método do Explante.....	31
4.3.3 – Técnica para obtenção de metáfases a partir de cultura de células de cartilagem humana.....	33
4.4 – Métodos estatísticos.....	34
4.4.1 – Método estatístico para cálculo do tamanho amostral.....	34
5 – RESULTADOS	36
5.1 – Avaliação dos dados clínicos da amostra.....	37
5.2 – Características do crescimento das culturas de tecidos fetais dos recém-nascidos que foram a óbito no período perinatal.....	41
6 – DISCUSSÃO	46
6.1 – Avaliação de alguns dados clínicos na casuística total que constituem fatores de risco na mortalidade perinatal.....	47
6.1.1 – Sexo do recém-nascido.....	47

6.1.2 –	Idade gestacional.....	48
6.1.3 –	Peso ao nascimento.....	49
6.1.4 –	Idade Materna.....	50
6.1.5 –	Causas do óbito.....	51
6.1.6 –	Paridade.....	54
6.2 –	Técnicas de cultivo celular.....	55
6.3 –	Frequências e tipos de aberrações cromosômicas entre os recém-nascidos que evoluíram para óbito no período perinatal.....	56
7 –	CONCLUSÕES.....	60
8 –	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXOS.....		86
FIGURAS.....		91

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

	PG
Quadro 1 – Classificação da mortalidade infantil segundo a OMS (1977).....	04
Tabela 2.2.1 – Frequência dos diferentes tipos de anomalias cromossômicas em abortos espontâneos. Boué (1985).....	17
Gráfico 2.2.1 – Representação da frequência das perdas gestacionais e da porcentagem das anomalias cromossômicas de acordo com o estágio de desenvolvimento do conceito. Extraído de Boué (1989).....	17
Tabela 2.2.2 - Frequência e distribuição de anomalias cromossômicas em diferentes fases do desenvolvimento humano (gestações clinicamente detectadas). Baseado em Hassold (1986).....	18
Tabela 2.2.3 – Frequência de anomalias cromossômicas entre óbitos perinatais (% total de anomalias cromossômicas). Baseado em Angel <i>et al</i> (1984).....	19
Tabela 2.2.4 – Comparação dos resultados citogenéticos de diversos estudos de investigações cromossômicas em natimortos previamente publicados com os do WiSSP. Baseado em Pauli <i>et al</i> (1994).....	20
Tabela 5.1 – Razão de sexo entre natimortos e óbitos neonatais na amostra total.....	37
Tabela 5.2 – Distribuição dos recém-nascidos de acordo com a idade gestacional na amostra total.....	38
Tabela 5.3 – Distribuição dos fetos de acordo com o peso ao nascimento na amostra total.....	38
Tabela 5.4 – Distribuição dos óbitos perinatais de acordo com a idade materna.....	39
Tabela 5.5 – Causas de mortalidade dos recém-nascidos que foram a óbito no período perinatal.....	39
Tabela 5.6 – Distribuição das malformações congênitas maiores e menores detectadas no grupo dos malformados e correlacionadas com a época do óbito.....	40
Tabela 5.7 – Correlação entre a paridade das gestantes e a época do óbito (natimortos e óbitos neonatais).....	41
Tabela 5.8 – Avaliação das taxas de sucesso de cultivo celular nos diferentes tecidos estudados correlacionados à época do óbito dos recém-nascidos.....	42
Tabela 5.9 – Achados citogenéticos correlacionados com o fenótipo dos recém-nascidos.....	42
Tabela 5.10 – Achados citogenéticos correlacionados ao sexo dos recém-nascidos.....	43
Tabela 5.11 – Achados citogenéticos correlacionados com o período do óbito.....	43

Tabela 5.12 – Incidência e tipos de aberrações cromossômicas na amostra relacionados com o sexo do recém-nascido.....	44
Tabela 5.13 – Correlação entre os achados citogenéticos, idade gestacional, peso ao nascimento, idades materna e paterna e principais defeitos congênitos encontrados entre os óbitos perinatais com cariótipos anormais.....	45
Figura 1 – Fotomicrografia de metáfase obtida por cultivo de condrócitos humanos.....	92
Figura 2 – Cariótipo montado a partir de uma metáfase obtida por cultivo de condrócitos humanos – paciente de número 6.....	93

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos: a avaliação da eficiência de uma técnica que permitisse o estudo citogenético de tecidos fetais de recém-nascidos cujos óbitos ocorressem no período perinatal, incluindo os fetos macerados; a avaliação da frequência de anomalias cromossômicas entre esses fetos e a avaliação dos dados clínicos da população estudada. Essa investigação foi realizada através do estudo desses recém-nascidos cujos nascimentos ocorreram no CAISM-UNICAMP. O material para a investigação consistiu dos seguintes tecidos: sangue, pele ou cartilagem. Nos fetos macerados coletou-se somente cartilagem, enquanto que, nos não macerados procedeu-se a coleta de sangue ou pele e cartilagem. Para os estudos citogenéticos, a partir de linfócitos de sangue e de fibroblastos de pele, utilizou-se técnicas estandarizadas enquanto que para os condrócitos seguiu-se a técnica descrita por Urioste (*Am J Med Genet* 46:123, 1993) com modificações. A presente amostra foi formada predominantemente por fetos do sexo masculino, no entanto, a razão de sexo entre os fetos com cariótipos alterados foi de 1:3. A maioria dos fetos apresentou uma idade gestacional entre 28 e 36 semanas, pesou entre 500 e 1.500 g; 80% das idades maternas foram iguais ou inferiores a 30 anos. A maioria dos fetos dessa amostra era portadora de defeitos congênitos, 54,4%, e os principais defeitos estruturais acometiam os sistemas nervoso e urinário. Os resultados da avaliação citogenética indicaram uma frequência total de anomalias cromossômicas de 11,0% (17,1% entre os recém-nascidos malformados e 3,1% entre os não-malformados), sendo essa frequência de 18,7% entre os natimortos e de 8,8% entre os óbitos neonatais. A taxa de sucesso com as culturas de condrócitos foi de 51,2%, a maioria das perdas ocorreram com as amostras de tecidos oriundos de fetos macerados. A alta frequência de aberrações cromossômicas nessa amostra é decorrente de um viés de amostragem – coleta preferencial de material de malformados. Sobre a cultura de condrócitos, os dados do presente trabalho permitem concluir a sua ineficácia no estudo do feto macerado de longa data, bem como, a sua utilidade como método complementar na investigação citogenética desses fetos.

ABSTRACT

The aims of the present study were the evaluation of a technic that makes possible the cytogenetic study of newborn babies' foetal tissue whose death happened in perinatal period including the macerated foetus, the estimate of their chromosomal aberration and the clinical data of the investigated population. That investigation carried out by the methodical study of those newborn babies whose births have taken place at CAISM-UNICAMP. The material for the investigation was the following tissues: blood, skin or cartilage. Only cartilage was collected from the macerated foetus, while blood and skin were collected from non-macerated ones. For the cytogenetic studies, standard technics were used with lymphocytes from blood and fibroblasts from the skin, while the technic related by Urioste, with some changes, (*Am J Med Genet* 46:123,1993) was used with chondrocytes. Male foetus constituted predominantly the present sample, but the proportion of female foetus with changed karyotype was about three female foetus to one male foetus. The majority of foetus were between 28 and 36 weeks old, weighted between 500 and 1500 grams and 80% of their mothers aged 30 years or younger. The greater number of foetus from that sample had congenital abnormality (54,4%) and the main abnormalities were in relation to the nervous system and urinary system. The results of the cytogenetic estimate showed a total frequency of genetic abnormalities of 11,0% (17,1% belongs malformed babies and 3,1% in the group of non-malformed), from which 18,7% belongs to the stillborn babies and 8,8% to the neonatal deaths. The success rate for the chondrocytes cultures were 51,2% and the majority of losses owe to the samples of macerated foetus' tissues. The increasing frequency of genetic abnormalities in that sample happens because there were a preferential collect of malformed babies' material. About the cultures of chondrocytes, the data of the present study allow to conclude its inefficacy on the study about the long date macerated foetus and its usefulness as a complementary method on the cytogenetic investigation of those foetus.

1 – INTRODUÇÃO

As taxas de mortalidade infantil estão progressivamente sendo reduzidas nos últimos anos, concomitantemente à melhoria dos serviços de saúde no que se refere aos cuidados com as crianças, e os óbitos de crianças com idade inferior a 365 dias de vida passou a se concentrar, preferencialmente, nas semanas mais próximas ao nascimento. Dessa forma, a mortalidade neonatal (durante os primeiros 28 dias de vida) passou a constituir quase que a única responsável pela mortalidade infantil nos países desenvolvidos. Segundo Opitz (1984) e Gomes & Santo (1997) aproximadamente 70% da mortalidade infantil ocorre no período neonatal (do nascimento até o final do primeiro mês – sendo que 40% ocorre no primeiro dia de vida e 30% no período neonatal tardio) e 30% do primeiro mês até o término do primeiro ano de vida.

Nos países desenvolvidos, como nos Estados Unidos, a mortalidade infantil foi reduzida a valores em torno de 12 por mil nascidos vivos, enquanto que, a taxa de mortalidade fetal situa-se em torno de 8 natimortos por mil, sendo que cerca de 30% das mortes fetais correspondem a fetos entre a 20ª e 28ª semana de gestação, pesando menos de 1000 g, e 70% a fetos com idade gestacional de 28 semanas ou mais (Opitz, 1984). Na Suécia, os coeficientes de mortalidade perinatal não ultrapassam 5/1000 segundo Haglund *et al* (1993) enquanto que, no Brasil essas taxas podem ser consideradas altas pois, nas regiões mais desenvolvidas este coeficiente situa-se entre 16/1000 e 22/1000 (Betiol *et al*, 1998; Menezes *et al*, 1998), atingindo, nas regiões menos desenvolvidas, taxas bem mais elevadas, em torno de 30/1000 (Ferraz & Gray, 1990). Tais taxas podem ser explicadas pelas condições sócio-econômicas desfavoráveis bem como pelas deficiências na assistência médica. Importante também é o conhecimento do que ocorre nesse período pois, atualmente, em muitos países, o número de óbitos perinatais é muito mais elevado do que o observado nos anos subseqüentes, muito embora, a duração do período perinatal corresponda a aproximadamente 0,5% da duração média da vida humana (Laurenti, 1984).

O estudo das causas dos óbitos perinatais pode levar à adoção de programas de assistência materno-infantil e outras ações específicas que visem a redução da mortalidade perinatal e, conseqüentemente, da mortalidade infantil. De acordo com Gomes & Santo (1997), no grupo de óbitos ocorridos até 27 dias após o nascimento, 22,2% poderiam ser evitados por cuidados adequados no parto, 20,5% poderiam ser reduzidos através de diagnóstico e tratamento precoce, 13,7% por um bom controle da gravidez e somente 7,9% seriam inevitáveis.

Como as perdas fetais e os óbitos neonatais, em geral, devem-se a causas e fatores comuns, torna-se importante estudá-las em conjunto, englobando-as como óbitos perinatais, isto é, óbitos de recém-nascidos ocorridos no período perinatal (Laurenti, 1984). A expressão “mortalidade perinatal” foi proposta por Peller (1940) para designar a soma dos nascidos mortos e os óbitos ocorridos durante a primeira semana após o nascimento, considerando-os como uma unidade estatística por possuírem, em comum, um conjunto complexo de causas que diferiam do padrão de causas de óbitos em crianças mais velhas.

No entanto, em diferentes países existem critérios diferentes para definir o período perinatal, bem como para calcular as taxas de mortalidade perinatal e, por essa razão, a Organização Mundial de Saúde recomenda a estandarização da classificação e definições a esse respeito. De acordo com OMS (1977), as definições, a terminologia e a estrutura das tabelas estatísticas relativas ao período perinatal recomendadas podem ser expressas da maneira como é explicitado abaixo:

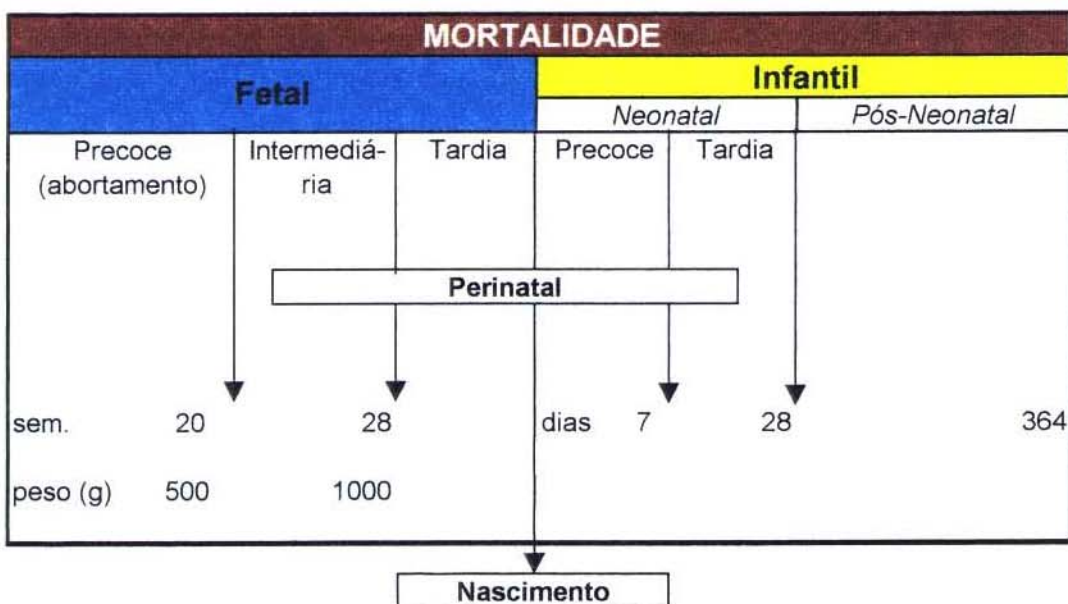
- Nascimento é “expulsão completa ou a extração completa do corpo da mãe de um conceito, independente da duração da gestação”.
- Nativivo é “quando o conceito respira ou mostra qualquer outra evidência de vida, tais como, batimento cardíaco, pulsação do cordão umbilical, ou movimentos definidos por músculos voluntários, quer o cordão umbilical tenha ou não sido cortado ou esteja a placenta desprendida”.
- Morte fetal é definida como “a morte antes da expulsão completa ou extração do corpo da mãe de um conceito independentemente da duração da gestação; a morte é indicada pelo fato de que, após essa separação, o feto não respira ou demonstra qualquer sinal de vida, tal como batimento cardíaco, pulsação do cordão umbilical ou movimentos definidos por músculos voluntários”. Entre as perdas fetais temos: os abortamentos (perdas com idade gestacional menor que 20 semanas e/ou peso inferior a 500g) e os natimortos (perdas com idade gestacional igual ou superior a 20 semanas e/ou peso igual ou maior que 500g), (Quadro 1).

Para o registro de dados de óbitos perinatais em âmbito nacional e internacional são feitas recomendações separadas. Para o primeiro caso, o registro limite é o peso ao nascimento de, no mínimo, 500 g, ou, idade gestacional de 22 semanas completas ou comprimento de 25 cm, aplicando-se esse critério tanto a nativivos quanto a natimortos.

Para fins de comparação internacional de dados estatísticos estandarizados de mortalidade perinatal é aceito o critério de peso mínimo de 1000 g ou, idade gestacional de 28

semanas completas ou estatura de 35 cm. Porém, o critério-chave nas recomendações da OMS (1977) é o peso ao nascimento devido ao fato de ser um dado mais freqüentemente registrado do que a idade gestacional. Em muitos países ocidentais, há preferência pelo critério de “idade gestacional” em vez de “peso ao nascimento”, e isto baseia-se no fato de que o primeiro é mais útil na tomada de decisões médicas durante a gestação, por suas relações biológicas diretas com parâmetros como crescimento e maturação fetais (Richardus *et al*, 1997).

Quadro 1 – Classificação da mortalidade infantil segundo a OMS (1977).



2 - ANTECEDENTES NA LITERATURA

Inegavelmente, avanços notáveis têm-se verificado durante as últimas décadas na área médica, em especial, no que concerne à reprodução humana e seu controle, procedimentos e cuidados durante a gestação, parto, período pós-natal, e, até mesmo no que se refere às técnicas de reprodução assistida. A despeito de tais progressos, as taxas de perdas gestacionais na espécie humana continuam muito altas, tomando-se importante a investigação de sua etiologia, uma vez que casais com história clínica de perdas recorrentes são freqüentemente enviados para aconselhamento genético. Estudos populacionais efetuados em vários países, utilizando metodologias variadas, estimaram que a taxa de fecundidade seria muito baixa na espécie humana. A causa consistiria na alta taxa de mortalidade intra-útero ocorrida no período entre a fecundação e o parto (Edmonds *et al*, 1982).

Embora os dados das diversas pesquisas não sejam absolutamente concordantes, no que respeita à incidência de abortos espontâneos e óbitos perinatais, Jacobs (1986) avaliou que 75% do total das gestações não chegam a termo, de tal modo que 25% são perdidas antes da implantação uterina, 33% no período pós-implantação precoce, 15 a 20% entre a quinta e a vigésima sétima semana e 1 a 2% em períodos mais tardios, correspondendo aos recém-nascidos que evoluem para óbito no período perinatal.

A mortalidade no período perinatal está associada a vários fatores de risco relacionados ao conceito, tais como: duração da gestação, peso ao nascimento, gemelaridade, sexo, apresentação não-cefálica e anomalias congênitas, ou, à gestante, tais como: idade materna, história obstétrica, estado marital, imigração, tabagismo, fatores sociais, doenças maternas crônicas, tratamento anti-esterilidade, doenças e complicações da gestação (Golding, 1991; Richardus *et al*, 1997). Opitz (1984), apontou como as maiores causas de óbitos perinatais, a anóxia seguida pela prematuridade, e, como terceira principal causa, as malformações congênitas. Segundo Gomes & Santo (1997) as principais causas de óbitos em um grupo de crianças com menos de um ano de vida, que incluíam os óbitos perinatais, foram: imaturidade ou asfixia – 58,7%, infecções – 19,6% e anomalias congênitas – 12,2%. Para Galan-Roosen *et al* (1998), em estudo prospectivo realizado no período de 1983 – 1992 na Holanda, a principal causa de mortalidade perinatal foram as malformações congênitas – 33%, sendo que malformações congênitas letais foram encontradas em 51% dos natimortos (principalmente as que afetam o sistema nervoso central) e em 70% dos óbitos neonatais (principalmente defeitos cardiovasculares e pulmonares). Outras causas de mortalidade encontradas entre os natimortos: insuficiência placentária progressiva – 33%; asfixia aguda – 5,5%; hemorragias placentárias e problemas de cordão umbilical – 2,5% entre outras; no grupo dos óbitos

neonatais outras causas freqüentes foram: imaturidade – 7%, asfixia aguda, hemorragia cerebral e sépsis neonatal com 2,3% cada uma.

Nas últimas décadas, tem ocorrido um acentuado declínio nas taxas de mortalidade perinatal nos países industrializados; isto é devido, principalmente, ao declínio das taxas de óbitos por prematuridade e doenças infecciosas, graças aos progressos tecnológicos que permitiram melhores cuidados pré e pós-natais, e ao uso generalizado de métodos de investigação das malformações durante a gestação (o que pode elevar a taxa de indicações para abortamentos). Entretanto, as mortes por malformações congênitas não sofreram uma redução significativa, pelo contrário, tornaram-se relativamente mais importantes e, atualmente, são responsáveis por 20 a 30% dos óbitos perinatais nos países ocidentais desenvolvidos (Goldenberg & Humphrey, 1983; Winter *et al*, 1988; Forssas *et al*, 1998; Galan-Roosen *et al*, 1998). As malformações congênitas têm-se mostrado uma causa recalcitrante de mortalidade infantil e, como a maioria de outros problemas têm sido atenuados gradualmente ao longo dos últimos anos, o impacto das malformações congênitas tende a aumentar.

As malformações congênitas resultam não apenas em mortalidade, mas também, em morbidade considerável e, dependendo do critério de classificação pode-se afirmar que cerca de 3% de todos os nascimentos estão associados com malformações maiores, muitas das quais deixam seqüelas duradouras (Kalter & Warkany, 1983; Cornel *et al*, 1991). Considerando-se essas informações e objetivando uma possível prevenção e/ou tratamento, o interesse na patogênese das anomalias do desenvolvimento tem aumentado muito ultimamente. Um grande número de fatores, com um papel significativo na etiologia dos defeitos congênitos, tem sido investigado, bem como o potencial de intervenção preventiva em cada caso. Os fatores genéticos contribuem com aproximadamente 15% a 25% (gênicos – 2 a 10%; cromossômicos – 10 a 15%) para todos os casos de anomalias congênitas, enquanto que os fatores ambientais (agentes teratogênicos, doenças maternas, fatores uterinos e placentários) com 8 a 12%. Entretanto, em cerca de 40 a 60% dos casos, a etiologia é desconhecida e, em 20 – 25% é multifatorial (Stevenson, 1993).

Estudos prospectivos realizados na Austrália por Beischer (1995) constataram que as anomalias congênitas maiores continuam a ser a segunda maior causa de mortalidade perinatal sendo superada apenas pela prematuridade, embora tenham ocorrido grandes alterações nos índices de causas fetais de natimortalidade nos últimos dez anos e que deverão se alterar mais ainda no futuro com os avanços cada vez maiores no campo das cirurgias pediátricas efetuadas logo após o nascimento ou mesmo intra-útero para correção de malformações cardíacas,

renais, hidrocefalia entre outras. Na população estudada de portadores de malformações maiores, a frequência de aberrações cromossômicas foi de 13,8%. A detecção dessas anomalias foi efetuada através do estudo citogenético de vilo coriônico, após constatação de malformações fetais por ultra-sonografia. Realizado o aconselhamento genético e a interrupção de gestações com anomalias maiores (especialmente defeitos do tubo neural), fato que contribuiu para redução geral de 30% no número de óbitos de crianças com malformações maiores, não houve concomitantemente uma redução significativa no número de malformações cardíacas e do sistema circulatório. Talabani *et al* (1998), nos Emirados Árabes Unidos, encontraram uma frequência de 16,6/1000 crianças com malformações congênitas maiores em uma população estudada de 24233 recém-nascidos, com uma frequência de anomalias cromossômicas de 19% nesse grupo. Dentre os portadores dessas malformações, o risco de recorrência estimado foi maior que 1% em 67% dos casos; em 24% deles o risco de recorrência foi maior que 10%. Nos trabalhos de Galan-Roosen *et al* (1998) dentre 50 óbitos perinatais causados por malformações congênitas, 20% eram portadores de anormalidades cromossômicas; demonstrando a importância das aberrações cromossômicas na espécie humana.

2.1 Anomalias Cromossômicas

O conteúdo genético do óvulo e do espermatozóide fornece ao conceito todas as instruções necessárias à formação e funcionamento de um novo organismo. Porém, alterações no material genético, tais como anormalidades numéricas ou estruturais dos cromossomos, ou na natureza desse material – mutações gênicas – podem prejudicar a formação normal e ocasionar um grande número de anomalias congênitas ou outras alterações morfológicas e fisiológicas que conduziram à mortalidade ou à morbidade do conceito.

Entretanto, cromossomos e genes normais não asseguram um desenvolvimento normal, pois existe um grande número de fatores ambientais que podem exercer um papel injurioso importante na gênese das malformações congênitas durante o período gestacional. Procedimentos clínicos e laboratoriais conseguem determinar aproximadamente 50% das causas de anomalias entre nativos e a metade delas são total ou parcialmente de origem genética (Stevenson *et al*, 1993).

2.1.1 Definições e mecanismos das anomalias cromossômicas

Anomalias cromossômicas podem ser definidas como alterações do genoma humano que se caracterizam por perda, excesso ou rearranjo do material genético e, geralmente detectadas ao microscópio óptico (Thompson & Thompson, 1991).

As anomalias cromossômicas podem afetar o número ou a estrutura dos cromossomos e envolver um ou mais autossomos, cromossomos sexuais ou ambos.

Anomalias cromossômicas numéricas - As aberrações cromossômicas numéricas mais freqüentes na espécie humana correspondem às aneuploidias (monossomias e trissomias) e às euploidias (triploidias e tetraploidias).

Os mecanismos que originam as aberrações numéricas consistem em erros na mecânica da divisão celular ocorrendo durante a gametogênese, no momento da fecundação ou durante as primeiras divisões da célula-ovo, a despeito dos pais apresentarem uma constituição cromossômica normal (Boué, 1989).

O processo reprodutivo na espécie humana depende da produção de gametas através da meiose (ou divisão reducional). O número diplóide das células primordiais deve ser reduzido à metade durante a maturação dos gametas nos testículos ou ovários. É durante o processo da meiose que se origina a maioria das anomalias cromossômicas numéricas devido principalmente a falhas na disjunção normal dos cromossomos homólogos (não-disjunção). Quando um gameta anormal (com número cromossômico diferente de 23) participa da fecundação, dá origem a um zigoto com número cromossômico anormal. As conseqüências desse evento podem ser: mais freqüentemente, a perda gestacional por falha na implantação uterina do conceito ou aborto durante as primeiras semanas de desenvolvimento (Boué, *et al*, 1975; Warburton *et al*, 1980; Grouchy & Turleau, 1984; Cavalcanti, 1990) ou, menos freqüentemente, a formação de conceitos malformados cujas gestações prosseguem até o terceiro trimestre, provocando além das malformações, distúrbios de crescimento e das funções mentais nos que sobrevivem por mais tempo (Grouchy *et al*, 1984; Schinzel, 1984).

O fenômeno da não-disjunção pode ocorrer na meiose I, na meiose II ou na mitose. Entretanto, com base em evidências experimentais em humanos, é um evento mais freqüentemente associado à meiose I materna (Griffin, 1996). Na gametogênese feminina, a não-disjunção pode ocorrer durante todo o processo meiótico, mas a grande maioria dos casos de não-disjunções ocorre na meiose I da ovogênese. Com o advento da fertilização "in-vitro", um certo número de ovócitos tem sido investigado

citogeneticamente e, a partir desses estudos, verificou-se que de 4 a 30% dos ovócitos são aneuplóides (Martin *et al*, 1986; Pellestor *et al*, 1989). Com relação aos espermatozóides, foram encontradas anormalidades cromossômicas numéricas em cerca de 1 a 5% dos espermatozóides produzidos por homens normais (Brandiff *et al*, 1985; Martin *et al*, 1985).

Durante o processo meiótico pode ocorrer um erro envolvendo todo o conjunto cromossômico, e, que resulta na formação de um gameta diplóide (46 cromossomos) que após a fusão com um gameta normal origina um zigoto triplóide (69 cromossomos) por diandria ou por diginia, respectivamente, se o erro ocorreu durante a espermatogênese ou a ovulogênese (Boué, 1989). Zigotos triplóides também podem se originar por erros no momento da fecundação, quando dois espermatozóides penetram ao mesmo tempo no óvulo (dispermia). Considere-se ainda os casos em que pode ocorrer uma duplicação cromossômica sem a divisão subsequente da célula-ovo, conduzindo à formação de um ovo tetraplóide (92 cromossomos). Além desses casos, a não-disjunção mitótica pode originar o mosaicismo (o indivíduo apresenta dois ou mais complementos cromossômicos diferentes) quando ocorrer durante as divisões celulares subsequentes à concepção.

2.1.2 Principais anomalias cromossômicas numéricas

As aneuploidias, presença de um ou mais cromossomos extras ou perda de cromossomos (Griffin, 1996), são as causas mais freqüentes de retardo mental e perdas gestacionais na espécie humana, que apresenta baixa tolerância a elas. Como consequência, a maioria produz uma desorganização tão grave do conceito que a nidação e o desenvolvimento embrionário não são possíveis. As mais comuns são as trissomias, que ocorrem em 50% dos abortos cromossomicamente anormais, em 35% de todos os abortos espontâneos, em 4% de todos os natimortos e em 0,3% dos nativos (Hassold *et al*, 1980; Hassold & Jacobs, 1984; Boué *et al*, 1989; Eiben *et al*, 1990; Hassold *et al*, 1995).

Trissomias para todos os cromossomos humanos já foram descritas em perdas gestacionais precoces, exceto para o cromossomo 1. O primeiro caso de trissomia 1 em nossa espécie, foi detectado em um embrião de oito células resultante de técnica de fertilização "in-vitro" (Watt *et al*, 1987), embora, com alguma freqüência tenha sido constatada a presença de um cromossomo 1 extra em espermatozóides humanos com o

auxílio do teste de hamster (Martin *et al*, 1983; Brandiff *et al*, 1985; Martin & Radmaker, 1987). A maioria das trissomias é letal e, entre elas, a mais freqüente é a trissomia 16 (Creasy *et al*, 1976; Warburton *et al*, 1980; Cavalcanti, 1990). Trissomias dos cromossomos 13, 18 e 21 são melhor toleradas, e, embora freqüentemente causem abortamento, elas constituem as aberrações cromossômicas autossômicas mais comumente encontradas no terceiro trimestre gestacional.

A incidência da trissomia 13 é de cerca de 1 em 20.000 nascimentos. A síndrome de Patau é clinicamente grave e fatal, estimando-se que a metade dos indivíduos afetados morre no primeiro mês de vida. Do mesmo modo como em outras trissomias, associa-se à idade materna avançada e o cromossomo extra, em geral, é proveniente da não-disjunção na meiose I materna (Hassold *et al*, 1987; Hassold & Sherman, 1993; Griffin, 1996). Com relação à trissomia 18, a incidência entre nativivos é de 1 em 10.000 aproximadamente, e, embora a freqüência seja bem alta na concepção, cerca de 95% dos conceptos portadores dessa anomalia são abortados espontaneamente. O período de sobrevida após o nascimento é baixo e de apenas alguns meses, sendo extremamente rara a sobrevivência por períodos mais longos, exceto para os casos de mosaicismo, onde o fenótipo é menos grave. É mais freqüente entre os conceptos do sexo feminino, em uma proporção de 4:1. A idade materna avançada é também um fator predisponente nessa síndrome, bem como nas demais trissomias.

A trissomia 21 (síndrome de Down) é uma das anomalias cromossômicas compatíveis com a vida mais freqüentes em humanos e ocorre em cerca de 1 em cada 750 nascidos vivos (Griffin *et al*, 1996). Hoshi *et al* (1999) encontraram uma incidência aproximada de 1 em 1000 nascimentos no Japão, e, sua correlação com idade materna avançada (35 anos ou mais) já foi bem estabelecida há longo tempo e encontrada em todos os grupos étnicos, raciais e sócio-econômicos (Penrose & Smith, 1966; Hook, 1982; Hoshi *et al*, 1990).

Aproximadamente 75% dos conceptos com a trissomia 21 são abortados espontaneamente no primeiro trimestre de gestação, e uma porcentagem menor é perdida mais tardiamente, sendo que alguns nativivos evoluem para óbito logo no início do período pós-natal. Em todos esses casos, a causa da morte freqüentemente está associada a cardiopatia congênita grave.

Trissomias completas para a maioria dos outros autossomos causam abortamentos espontâneos (Warburton *et al*, 1980; Grouchy & Turleau, 1984; Shinzel,

1984). Com relação às trissomias dos cromossomos sexuais (XXX; XXY e XYY) observa-se que conferem a seus portadores fenótipos menos graves e são relativamente freqüentes, com uma incidência geral de 1 em cada 650 nascidos vivos, constituindo, dessa forma, as anomalias cromossômicas mais comuns entre nativos. Geralmente, a presença de um ou mais cromossomos sexuais adicionais X ou Y não é acompanhada de malformações. Isto se deve ao fato de que ocorre, rotineiramente, a inativação de todos menos um cromossomo X em cada célula, e, à escassez de genes ativos localizados no cromossomo Y. Cromossomos sexuais extranumerários podem produzir alterações de crescimento (XXY, XYY, XXX), de maturação sexual (XXY), e de comportamento (XXY, XYY) (Stevenson *et al*, 1993).

Monossomias completas para quaisquer cromossomos, com exceção do X, não são encontradas entre nativos (Czulman, 1965; Jacobson & Barter, 1967). As monossomias autossômicas proporcionam ao organismo um risco tão alto de expressão hemizigótica de genes deletérios que este não sobrevive durante o período pré-natal. Da mesma forma, a constituição cariotípica 45, Y (nulissomia de X) é letal na espécie humana, uma vez que numerosos genes do cromossomo X são necessários para o desenvolvimento embrionário normal.

Por outro lado, a monossomia X, uma das aneuploidias mais comuns, está associada a um fenótipo clínico relativamente brando entre nativos e é altamente letal no período pré-natal. Estima-se que menos de 0,3% de conceptos portadores da monossomia X sobrevivem a termo (Hassold *et al*, 1995).

As triploidias (69 cromossomos) são anomalias cromossômicas relativamente comuns em nossa espécie, devido a uma alta freqüência em abortos espontâneos cromossomicamente anormais – 15 a 20% (Boué, 1985), enquanto que, as tetraploidias (92 cromossomos) ocorrem em cerca de 5% dos abortos anormais (Kaji *et al*, 1980). Essas euploidias acarretam distúrbios tão graves e letais que virtualmente são encontradas apenas em abortos.

Mosaicismo - Anomalias cromossômicas numéricas também podem ocorrer por não-disjunção na anáfase mitótica, logo após a fertilização, acarretando o mosaicismo. O indivíduo afetado apresenta duas ou mais linhagens celulares cromossomicamente diferentes e todas derivadas de um único zigoto, sendo que uma das linhagens usualmente permanece normal (Stevenson, 1993). Indivíduos com mosaicismo,

tipicamente, desenvolvem fenótipos mais leves que os portadores de aberrações cromossômicas numéricas completas e, em geral, apresentam uma expectativa de vida mais longa.

A detecção do mosaicismo pode ser feita em um único tipo celular, por exemplo, linfócitos, ou pode necessitar de investigação em outros tecidos. Em geral, utiliza-se culturas de linfócitos e fibroblastos de pele para essa finalidade. Mosaicismo confinado a outros tecidos não pode ser excluído com esse procedimento.

Quando o mosaicismo se origina nos primeiros dias após a fecundação pode afetar não somente o embrião, mas também, os tecidos extra-embrionários ou ambos. Para investigá-lo no diagnóstico pré-natal, pode-se usar amostras de vilo coriônico que permitem a detecção do mosaicismo pela determinação do cariótipo das células citotrofoblásticas, da mesoderme extra-embrionária e de linhagens celulares fetais. Uma divergência nos achados cromossômicos entre duas ou mais dessas linhagens celulares ocorre em aproximadamente 2% de todas as gestações clinicamente reconhecidas (Griffin, 1996). Em um grande número de gestações que vão a termo, a anormalidade fica confinada à placenta, denominando-se "mosaicismo confinado à placenta" (MCP). Trabalhos recentes sugerem que a maioria das gestações com MCP evolui bem até o termo; entretanto, alguns casos estão associados com risco muito alto de perda fetal, óbito intra-uterino, retardo de crescimento intra-uterino, parto precoce, e/ou, possivelmente, peso de nascimento excessivamente alto. Esses eventos estão associados a níveis muito altos de células anormais, em geral, ocorrendo tanto no citotrofoblasto quanto no mesoderma extra-embrionário. Esse fenômeno (MCP) complica o uso de tecidos extra-embrionários como o vilo coriônico para diagnóstico pré-natal, porém, pode explicar a sobrevivência de fetos com certas trissomias graves. Kalousek *et al* (1989) demonstraram que fetos com trissomias 13 e 18, que sobreviveram até o final da gestação tinham placentas euplóides pelo menos parcialmente. Por outro lado, mosaicismo confinado à placenta tem sido utilizado para explicar o retardo de crescimento ou o abortamento espontâneo de fetos cromossomicamente normais (Kalousek & Dill, 1983; Gartner *et al*, 1988; Lestou & Kalousek, 1998).

2.1.3 Anomalias cromossômicas estruturais

Anomalias estruturais, possivelmente, originam-se durante a meiose devido a um pareamento anormal de seqüências homólogas e troca de material genético entre cromossomos diferentes ou entre partes do mesmo cromossomo. O mesmo tipo de mecanismo pode originar todas as diferentes formas de rearranjos estruturais, tais como, deleções, duplicações, translocações, inserções e inversões. Alguns rearranjos permanecem balanceados e não-disruptivos porque não há ganho nem perda de material genético no genoma total, ocorrem entre os genes não afetando as regiões reguladoras dos genes adjacentes, e, não acarretam alterações fenotípicas. No entanto, portadores de rearranjos cromossômicos equilibrados, como por exemplo, as translocações recíprocas, apresentam teoricamente a probabilidade de 2/3 de produzir gametas desbalanceados. Outros rearranjos são balanceados, porém disruptivos porque, normalmente, produzem fratura em um gene afetando sua transcrição ou causando alterações nas seqüências gênicas reguladoras, o que pode resultar em alterações fenotípicas (Stevenson, 1993).

Rearranjos desequilibrados resultam em perda ou ganho de material cromossômico ou ambos ao mesmo tempo. Podem surgir como mutações “de novo” ou como resultado de uma segregação desequilibrada de um rearranjo equilibrado em um dos parentais (Stevenson *et al* , 1993; Fryns & Buggenhout, 1998).

Outras anomalias cromossômicas - Quebras e rearranjos de cromossômicos típicos são observados em um pequeno grupo de síndromes monogênicas raras, além da síndrome do X frágil, que é relativamente comum. Como exemplos, pode-se citar a síndrome de Bloom (com acentuada troca entre cromátides-irmãs, associações tri e quadirradaiais), a anemia de Fanconi (quebras cromatídicas), ataxia-telangiectasia (quebras e rearranjos não-casuais entre os cromossomos 7 e 14), xeroderma pigmentoso entre outras. Em geral, essas síndromes estão associadas a um risco aumentado de câncer (Therman & Susman, 1995).

Separações centroméricas envolvendo primariamente os acrocêntricos e os cromossomos 1, 9 e 16 foram detectados em vários pacientes com a síndrome de Roberts (focomelia). A constrição centromérica desses cromossomos é perdida e dois centrômeros distintos alinhados com as duas cromátides podem ser observados com bandamento C. Embora a separação de centrômeros tenha sido observada em

indivíduos normais, nos portadores de várias doenças hematológicas e mulheres idosas, ela constitui um marcador útil para distinguir a síndrome de Roberts de outras síndromes com redução de membros (Therman & Susman, 1995).

2.1.4 Dissomia uniparental

Normalmente, o indivíduo herda um cromossomo de cada par de cada um de seus pais. Quando ambos os cromossomos de um par são herdados do mesmo parental, temos a dissomia uniparental. Diversos estudos demonstraram que um grande número de óbitos intra-uterinos e casos de retardo de crescimento intra-uterino grave estão associados com dissomia uniparental. Duas síndromes clinicamente distintas são associadas à dissomia uniparental do cromossomo 15: a síndrome de Prader-Willi (duas cópias de origem materna) e a síndrome de Angelman, menos freqüente (duas cópias de origem paterna). Vários casos dessas síndromes podem freqüentemente ser caracterizados por ocorrência de trissomia 15 nas células da placenta (Cassidy *et al*, 1992). A ocorrência esporádica de dissomia uniparental para outros cromossomos, como, por exemplo, 7,11 e 16 têm sido investigada e associada a outras síndromes clínicas (Kalousek, *et al*, 1992). É possível que as síndromes de Williams, Russel-Silver, Sotos, Rubinstein-Taibi e de Lange possam ser causadas por dissomia uniparental.

Finalmente, estudos no último quarto de século demonstraram a contribuição substancial das anomalias cromossômicas para as doenças humanas. Cerca de um em cada 200 nativos é cromossomicamente anormal, e desses, a maioria é portadora de alterações físicas e mentais significativas (Hassold, 1986). Embora essas condições sejam importantes do ponto de vista sócio-econômico e médico, elas representam apenas uma fração de todas as anormalidades cromossômicas humanas. A grande maioria dessas anomalias são incompatíveis com a sobrevivência a termo e estudos das perdas gestacionais espontâneas demonstraram que a espécie humana tolera um nível razoavelmente alto e variável de anormalidades cromossômicas. Desse fato decorrem implicações clínicas importantes, e também significam que é necessária a investigação das perdas gestacionais para uma melhor compreensão da etiologia das aberrações cromossômicas humanas.

2.2 Frequência de Aberrações Cromossômicas nas Perdas Gestacionais

Entre as perdas gestacionais precoces - abortos espontâneos clinicamente reconhecidos - as anomalias cromossômicas constituem, reconhecidamente, as causas de morte fetal mais importantes. Todos os estudos citogenéticos em tecidos de abortos espontâneos demonstraram a alta frequência de anomalias cromossômicas (vide tabela 2.2.1); 90% dessas perdas fetais ocorrem durante o primeiro trimestre e delas 50 a 60% são portadores de aberrações cromossômicas. A maior parte dessas anomalias determina uma interrupção no desenvolvimento embrionário (em geral entre a 3ª e a 7ª semana) seguida de retenção uterina, uma vez que o sistema hormonal materno continua funcionando por mais algum tempo (Warburton *et al*, 1980; Boué *et al*, 1985; Cavalcanti, 1990; Ohno *et al*, 1991).

Levando-se em conta que, em média, 15% de todos os conceptos humanos que nidam são abortados espontaneamente, estima-se que 7-8% são causados por anomalias cromossômicas (Hassold, 1986).

A frequência geral de aberrações cromossômicas entre os abortos espontâneos (50 - 60%) tende a cair na medida em que o desenvolvimento do conceito avança, ou seja, há um gradiente decrescente na taxa dessas aberrações, de modo que a frequência de 66% de anomalias cromossômicas entre os conceptos perdidos no período de 3-7 semanas cai para 25% entre os conceptos de 8-12 semanas e, em torno de 10-15% nos abortos tardios (2º trimestre); entre os óbitos perinatais tal frequência referida é de 7% em média (Boué & Boué, 1985). Vide gráfico 2.2.1.

A incidência de aberrações cromossômicas em nativos também é significativa, pois, corresponde a 6/1000 (Evans 1977; Hook, 1982). Destes, 2/1000 apresentariam rearranjos balanceados inofensivos, 2,5/1000 teriam anomalias nos cromossomos sexuais e cerca de 1,5/1000 apresentariam anomalias autossômicas clinicamente significativas.

Comparando as frequências dos principais tipos de anomalias cromossômicas entre os abortos espontâneos, natimortos e nativos, Hassold obteve os resultados demonstrados na tabela 2.2.2.

Tabela 2.2.1 - *Frequência dos diferentes tipos de anomalias cromossômicas em abortos espontâneos. Baseado em Boué (1985).*

Anomalias cromossômicas numéricas	%
Trissomias autossômicas	50 a 60
Monossomia X	15 a 20
Triploidias	12 a 20
Tetraplóidias	3 a 7
Mosaicos	0,5 a 4
Monossomias autossômicas	excepcionalmente raras
Anomalias cromossômicas estruturais	3 a 6

Gráfico 2.2.1 - *Representação da frequência das perdas gestacionais e da porcentagem das anomalias cromossômicas de acordo com o estágio de desenvolvimento do conceito. Extraído de Boué (1989).*

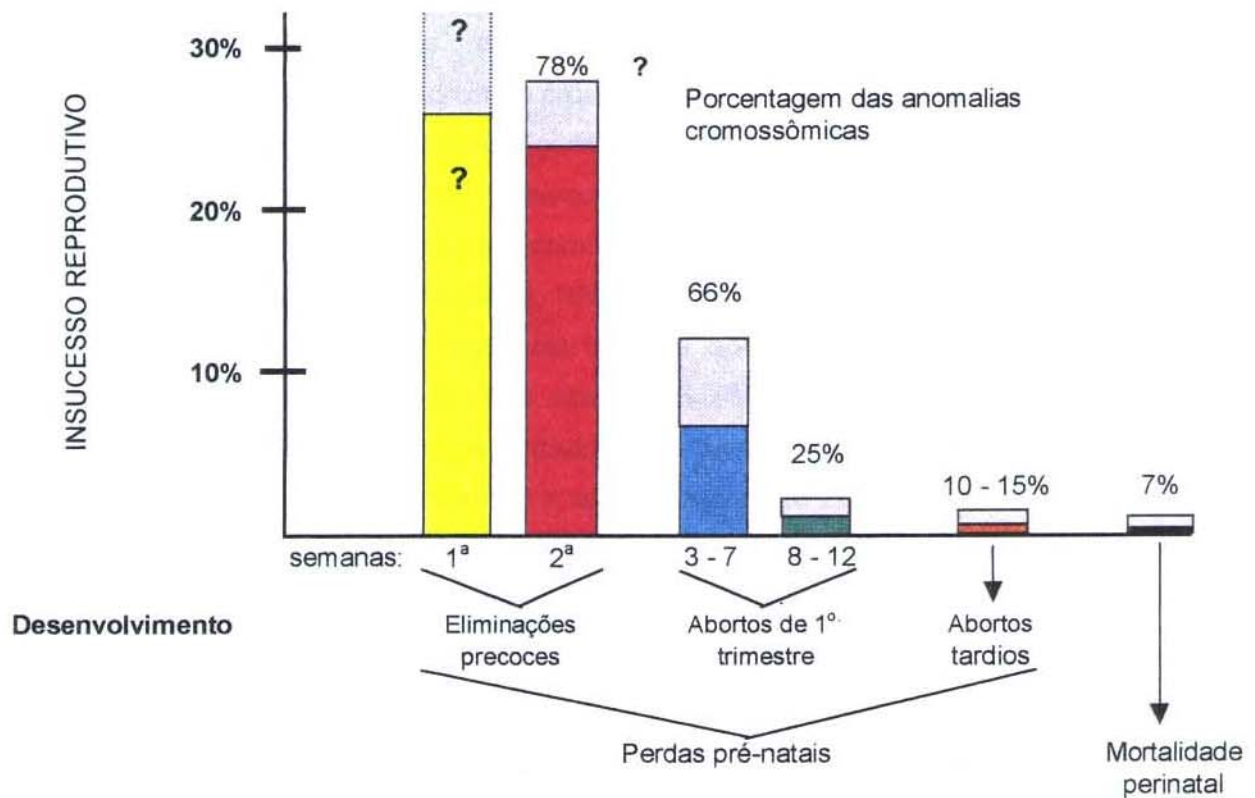


Tabela 2.2.2 - Frequência e distribuição de anomalias cromossômicas em diferentes fases do desenvolvimento humano (gestações clinicamente detectadas). Baseado em Hassold (1986).

Frequência de anomalias em %

Anomalias cromossômicas	Abortos Espontâneos	Natimortos	Nativos
Todas anomalias	50	5	0,5
Trissomias: 16	7,5	-	-
13, 18, 21	4,5	2,7	0,14
Demais trissomias	13,8	0,9	-
XXX, XXY, XYY	0,3	0,4	0,15
Monossomia X	8,7	0,1	0,01
Triploidia	6,4	0,2	-
Tetraploidia	2,4	-	-
Anomalias estruturais	2,0	0,8	0,3

De acordo com o observado nas tabelas 2.2.1 e 2.2.2, infere-se que entre os abortos espontâneos predominam as aberrações numéricas, principalmente as trissomias autossômicas, entre elas, a trissomia do cromossomo 16, cuja letalidade é tão alta que dela não se encontra nenhum caso nas populações de nativos e tampouco nas de natimortos. A monossomia do cromossomo X (45,X) associada à Síndrome de Turner constitui outra anomalia bastante freqüente entre os abortos espontâneos; menos de 1% dos conceitos portadores dessa aberração chegam a termo (Boué, 1985, Hassold *et al*, 1995).

Entre os natimortos, a freqüência total de aberrações cromossômicas varia de 5% (tabela 2.2.2) a cifras um pouco mais altas 6-7% (Shepard *et al*, 1979; Boué, 1985) e, se considerarmos apenas o grupo dos portadores de síndromes malformativas, a freqüência de anomalias cromossômicas corresponde a aproximadamente 20-25% (Boué, 1985; Talabani *et al*, 1998; Galan-Roosen *et al*, 1998). Predominam nessa população as trissomias, em particular as dos cromossomos 18, 13 e 21 (principalmente as duas primeiras que são mais letais) e as aberrações estruturais não balanceadas. Bem menos freqüentes são anomalias dos cromossomos sexuais (XXX, XXY, XYY) e os rearranjos estruturais que apresentam uma importância clínica considerável por ser uma parcela deles, derivados de portadores de rearranjos balanceados (exemplo: translocações robertsonianas), e, estes, por produzirem uma taxa elevada de gametas não balanceados, podem produzir descendência anormal, portadora de cariótipos não-balanceados.

Comparando-se esses resultados de estudos citogenéticos bastante representativos, entre os dois tipos de perdas gestacionais e nativos, fica bastante evidente o efeito do processo de seleção intra-útero, de modo que, ao término do período gestacional cerca de 95% dos conceitos cromossomicamente anormais foram eliminados (Hassold, 1986).

Diversas séries clássicas de estudos citogenéticos em tecidos fetais de óbitos perinatais foram publicadas nas últimas décadas (Bauld *et al*, 1974; Machin *et al*, 1974; Kuleshov, 1976; Albermann *et al*, 1977; Sutherland *et al*, 1978; Sutherland & Carter, 1983; Angell *et al*, 1984; Ellis *et al*, 1984; Young *et al*, 1986; Pauli *et al*, 1994).

Na tabela 2.2.3 estão relacionados os principais tipos de aberrações cromossômicas encontrados entre as perdas gestacionais do período perinatal.

Tomando-se os dados dessa tabela observamos que também predominam nessa população as trissomias 18, 21 e 13 (nessa ordem) seguidas dos rearranjos estruturais e anomalias dos cromossomos sexuais. Bem menos freqüentes, porém, importantes, são os casos de óbito perinatal associados ao cariótipo 45, X e à triploidia.

Mais recentemente, Pauli *et al* (1994) desenvolveram um programa de investigação etiológica de natimortalidade em Wiscosin (EUA)-Wiscosin Stillbirth Service Program (Wi SSP), em uma amostra de 1000 indivíduos, dos quais 789 eram natimortos e os demais incluíam óbitos neonatais e óbitos intra-uterinos com menos de 20 semanas de gestação. Após a realização da investigação citogenética, os resultados foram comparados com dados da literatura previamente publicados (Tabela 2.2.4).

Tabela 2.2.3 - *Freqüência de anomalias cromossômicas entre óbitos perinatais (% total de anomalias cromossômicas). Baseado em Angell et al, 1984.*

Tipo de conceito	Freqüência de aberração cromossômica (%)
Trissomia 21	17,5
Trissomia 18	28,5
Trissomia 13	10
Triploidia	4,5
Turner (45, X)	2
Outras anomalias dos cromossomos sexuais	11
Rearranjos estruturais	1
Outros	12

Tabela 2.2.4 - Comparação dos resultados citogenéticos de diversos estudos de investigações cromossômicas em natimortos previamente publicados com os do WiSSP. Baseado em Pauli *et al* (1994).

Referência	Total de culturas tentadas	Crescimento positivo (% do total)	Anormais (% de cariótipos anormais)
Angell <i>et al</i> , 1984	357	278 (77,9)	13 (4,7)
Bauld <i>et al</i> , 1974 Sutherland <i>et al</i> , 1978	381	241 (63,3)	14 (5,8)
Kuleshov, 1976	228	83 (36,4)	6 (7,2)
Machin, 1974; Machin & Crolla, 1974	345	156 (45,2)	8 (5,1)
Smith <i>et al</i> , 1990	98	45 (45,9)	7 (15,6)
Sutherland & Carter, 1983	72	48 (66,7)	7 (14,6)
Total	1481	851 (58,0)	55 (6,5)
WiSSP	696	296 (42,5)	39 (13,2)

Pauli *et al* (1994) categorizaram todas as causas fetais de natimortalidade na população referida, com base na etiologia provável e, nessa classificação descritiva, as aberrações citogenéticas corresponderam a 25% e as doenças mendelianas a 5% (do percentual total de diagnósticos fetais em natimortos). A avaliação citogenética permitiu a detecção de 13,2% de cariótipos anormais entre as culturas efetuadas com tecidos de natimortos. Os tecidos utilizados nas culturas para obtenção dos cariótipos foram: placenta, sangue de cordão umbilical, pele, "fascia", pulmão e gônada. Os trabalhos de Pauli *et al* (1994) relataram ainda a incidência relativa dos diversos tipos de anomalias cromossômicas, destacando como diagnósticos mais freqüentes: a Síndrome de Turner (16/1000, 11 natimortos); a Síndrome de Down (15/1000, 11 natimortos); a Síndrome de Edwards (14/1000, 10 natimortos); a Síndrome de Patau (6/1000, 4 natimortos), triploidia (6/1000, 1 natimorto), rearranjos estruturais não balanceados (8/1000, 5 natimortos) e mosaicos (3/1000, 3 natimortos). Importante ressaltar que o diagnóstico clínico de aberrações cromossômicas mais comuns foi realizado em alguns casos em que as culturas de tecidos para investigação citogenética não foram bem sucedidas. Isso permitiu o diagnóstico de 48 casos de anomalias cromossômicas (6,1%) entre os natimortos.

2.3 Avaliação dos Estudos Citogenéticos em Óbitos Perinatais e seus Resultados com Uso de Diferentes Técnicas de Cultivo Celular

A taxa de sucesso dos estudos citogenéticos varia de trabalho para trabalho, sugerindo entre outras coisas, diferenças laboratoriais. Kuleshov (Moscou, 1976) utilizou como material para investigação citogenética diferentes tecidos: pele, rim, gônada e sangue. Em natimortos macerados coletou rim e gônada, nos não-macerados, sangue de cordão umbilical e gônada e, nos recém-nascidos com óbito neonatal, sangue de punção cardíaca e pele. A taxa de crescimento positivo para os tecidos dos natimortos macerados foi de 15,4%, para os não-macerados 71,8%, entre os óbitos neonatais 68,1% (taxa total = 48,2%). Os estudos de Sutherland & Carter (1978) e Bauld *et al* (1978) foram realizados principalmente em fibroblastos de pele, placenta e líquido amniótico, com taxa positiva de sucesso de 77,3% e 90,6% respectivamente. Com os tecidos de natimortos macerados, a taxa de sucesso foi de 34,2% (Bauld *et al*, 1978). MacLeod *et al* (1979), em seu trabalho investigativo obteve taxas gerais de sucesso com suas culturas de tecidos fetais obtidos em necrópsias e leucócitos de 65,2%. Os trabalhos de Sutherland & Carter (1983), na Austrália, demonstraram que o sucesso das culturas de tecidos em abortos e óbitos perinatais, no total, foi de 89%, sendo que as maiores falhas ocorreram com os tecidos dos natimortos macerados.

Nos trabalhos de Pauli *et al* (1994), à semelhança de outros previamente publicados (Machin, 1974; Machin & Crolla, 1974; Kuleshov, 1976; Sutherland *et al*, 1978; Sutherland & Carter, 1983; Angell *et al*, 1984) houve uma taxa de insucesso muito significativa no crescimento das culturas de tecidos fetais. Dentre as tentativas de cultura obtiveram sucesso em apenas 43% dos casos de tecidos de natimortos e em 46% dos casos considerando-se a população-base total (que incluía natimortos, óbitos neonatais e abortos com menos de 20 semanas de gestação).

Analisando-se dados de pesquisas publicadas por outro ângulo, verifica-se que a maior incidência de anomalias cromossômicas ocorre entre os fetos macerados, principalmente aqueles com malformações múltiplas: 12,5% (Sutherland *et al*, 1978) e 9,5% (Angell *et al*, 1984). É importante destacar este fato porque a obtenção de culturas de tecidos obtidos em necrópsias (pele ou órgãos internos como pulmão, rim e gônada) para estudos citogenéticos é muito difícil, ou quase impossível com tais espécimes. Dada a alta frequência de anomalias cromossômicas entre os natimortos macerados, faz-se mister desenvolver técnicas que permitam o estudo citogenético de seus tecidos, com vistas ao aconselhamento genético dos

pais e a redução de sua recorrência familiar. Angell *et al*, (1984) preconizaram que, se o feto estiver macerado, a cultura de âmnio poderá ser bem sucedida. Para resolver o problema de insucesso das culturas de longa duração, Urioste (1993) propôs que a cultura de cartilagem da epífise tibial ou femural ou ainda da junção condrocostal poderia ser ideal para fetos macerados, uma vez que os condrócitos sobrevivem um tempo maior pós-morte que células de outros tecidos. Segundo seus resultados, o índice de sucesso com as culturas de condrócitos atingiu cifras gerais de 87%. Todas as falhas de crescimento de suas culturas ocorreram com cartilagem de natimortos, o que corresponde a 37,5% de perdas nesse grupo. O índice de sucesso ou falha das culturas de tecidos de natimortos pode ser explicado, provavelmente, por diferenças entre as datas de óbito intra-uterino e as de iniciação das culturas, grau de maceração e autólise dos tecidos fetais. Existe uma relação inversa entre o sucesso das culturas fetais e o intervalo entre óbito e iniciação das culturas.

2.4 Utilização de Técnicas Moleculares no Estudo Citogenético dos Óbitos Perinatais

Devido às altas taxas de falhas nas culturas de tecidos dos natimortos macerados, é necessário buscar outras técnicas adequadas à investigação da etiologia dos óbitos perinatais.

Com relação ao estudo genético dos natimortos macerados, quando a cultura de tecidos de longa duração não é possível devido ao seu alto grau de maceração ou autólise, são sugeridas técnicas de citogenética molecular variadas, como procedimentos alternativos de suma importância para o diagnóstico acurado de doenças genéticas, cromossomopatias e o aconselhamento genético adequado. Entre elas pode-se destacar: a genotipagem de fetos macerados (Deron *et al*, 1991), o emprego da técnica de FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) de cor única ou multicolorida em células fetais nucleadas (amniócitos, vilo coriônico, sangue de cordão umbilical, entre outras) em preparações diretas ou resultantes de culturas (Ward *et al*, 1991; Kuo *et al*, 1991; Klinger *et al*, 1992; Jobanputra *et al*, 1998; Zhen *et al*, 1999), a cariotipagem espectral multicolorida (SKY) e o uso de análise por QF – PCR (Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction) (Schröck *et al*, 1996; Adinolfi *et al*, 1997; Reddy *et al*, 1999; Haddad *et al*, 1999).

O estudo citogenético realizado rotineiramente nos conceitos que evoluem para óbito perinatal é importante, não só para o diagnóstico e conseqüentemente para o aconselhamento genético, mas também como orientador na pesquisa de identificação gênica de doenças mendelianas.

A esse respeito Tommerup (1993), em trabalho de revisão demonstrou a presença de diversos rearranjos cromossômicos associados com desordens mendelianas. Uma lista destas desordens tem sido descrita, constituindo uma parte do projeto "Human Gene Mapping Workshops". O primeiro sucesso no mapeamento de desordens mendelianas causadas por rearranjos cromossômicos foi a localização do gene da distrofia muscular Duchenne na região Xp21. Matsumoto *et al*(1988), investigando cinco homens portadores da Distrofia Muscular Duchenne (DMD) com quadro clínico sugestivo de uma alteração causada por genes contíguos, detectaram deleções visíveis em todos eles na região Xp21. MacCabe *et al*(1992), investigando dez deleções visíveis dentro da região Xp21 associadas a síndromes de genes contíguos, encontraram deleções submicroscópicas cujo tamanho variava de 4 a 14 Mb. Como deleções submicroscópicas são muito comuns em DMD, deleções intragênicas no "locus" 2.4Mb DMD podem, então, ser detectadas com o uso de bandamento de alta resolução. A partir desses fatos, aberrações cromossômicas como deleções, quebras ou rearranjos diferentes e genes mutantes específicos têm não somente auxiliado no mapeamento de outros "loci" responsáveis por doenças, como têm se tomado elementos-chave para um rápido isolamento de desordens genéticas por estratégia de posição clonal. Conquanto essas aberrações cromossômicas possam não ter implicações imediatas para traços mendelianos conhecidos, a dissecação molecular futura dessas desordens pode alterar esse quadro. Além das translocações insercionais, inversões e outros tipos raros de rearranjos familiares esporádicos têm sido identificados em associação com doenças mendelianas, durante investigações citogenéticas. Rearranjos intra-cromossômicos, incluindo "shifts", podem ser o tipo esperado de mutação em homens afetados pela maioria das doenças ligadas ao X (Tommerup, 1993).

Segundo Tommerup (1993), rearranjos estariam presentes em um pequeno, porém significativo, número de indivíduos afetados por doenças mendelianas, muitas já mapeadas e outras não. A detecção de uma mutação cromossômica em paciente portador de uma doença mendeliana forneceria indicações de possível localização gênica, além de ter implicações óbvias no aconselhamento genético. Considerando o impacto que um único rearranjo específico pode ter para o mapeamento e clonagem gênicos, Tommerup propõe um esforço mais sistemático para detectar esses arranjos.

Em síntese, a análise citogenética de aberrações numéricas e estruturais no diagnóstico pré e pós natal e mesmo na citogenética do câncer é uma parte essencial dos cuidados clínicos (Le Beau, *et al*, 1993). A técnica de FISH e outras técnicas moleculares têm demonstrado alta sensibilidade, especificidade e rapidez na resolução de anormalidades

cromossômicas, fornecendo aos geneticistas e pais condições mais precisas para o aconselhamento genético. No entanto, essas técnicas devem ser consideradas como ferramentas adicionais nas investigações citogenéticas, e não como substitutivas dos métodos empregados na rotina das culturas celulares "in-vitro", seguidas pela análise de metáfases coradas pelos procedimentos convencionais. As razões para isso são várias; em geral, as preparações de culturas de tecidos fornecem um maior número de metáfases e de melhor qualidade para o estudo citogenético; são menos sensíveis ao tempo de processamento decorrido entre a coleta e o lançamento das culturas. Já nas preparações diretas para as técnicas moleculares observa-se um declínio considerável nas taxas de sucesso das amostras entre aquelas processadas no mesmo dia ou um dia após a coleta e as que levam dois ou mais dias para serem processadas, de 79% vs 69% (Griffin et al, 1997). As culturas de tecidos são menos dispendiosas economicamente, enquanto que, as técnicas moleculares, como FISH, por exemplo, são muito caras, o que dificulta o seu emprego como exame de rotina nos laboratórios de citogenética. Além disso, os métodos tradicionais de cultivos celulares permitem, virtualmente, a detecção de todas as anormalidades citogenéticas, fornecendo um conjunto de informações bastante abrangentes sobre a constituição cromossômica dos propósitos, ou seja, uma análise completa do cariótipo.

3 – OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

1. avaliar a eficiência da técnica de cultivo de condrócitos para o estudo citogenético de recém-nascidos que evoluem para óbito no período perinatal, em particular os fetos macerados;
2. realizar um estudo citogenético em uma amostra de fetos que evoluem para óbito no período perinatal de modo a avaliar a frequência de aberrações cromossômicas entre:
 - 2.1 os fetos malformados
 - 2.2 e os fetos não malformados;
3. avaliar os dados clínicos da população estudada, tais como: sexo, peso, idade gestacional, causas dos óbitos e frequência de defeitos associados dos recém-nascidos, idade materna e paridade.

4 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

O Centro de Assistência Integral à Saúde da Mulher – CAISM – UNICAMP atende à cidade de Campinas e região, que se caracterizam como uma região agrícola-industrial com uma população de aproximadamente um milhão e meio de habitantes. No período de desenvolvimento desse projeto nasceram 5.700 crianças no CAISM, das quais 314 evoluíram para o óbito no período perinatal. A investigação desses óbitos inclui o trabalho de obstetras, ultra-sonografistas, neonatologistas, geneticistas e patologistas do Serviço de Medicina Fetal do referido hospital.

4.1 Coleta de dados clínicos

Como procedimento de rotina no CAISM, os recém-nascidos que evoluem para o óbito perinatal são, em geral, submetidos a: estudo radiológico (quando apresentam desproporções corporais ou quando apresentam suspeita ou evidência clínica de malformações ou displasias ósseas) e a autópsia. Também costuma ser rotineiro o estudo anátomo-patológico das respectivas placentas. A investigação citogenética apenas era efetuada, antes do presente trabalho, em fetos malformados com suspeita de cromossomopatia, independente se eles evoluíam ou não para o óbito perinatal.

Para a obtenção dos dados clínicos no presente estudo, de todos os fetos incluídos na amostra foram consultados: os prontuários hospitalares das mães e dos recém-nascidos. Dos recém-nascidos malformados, além desses, também foram consultadas as fichas ECLAMC (Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas)¹, Anexo 2, e as fichas clínicas do Ambulatório de Genética Perinatal no setor de Genética Perinatal do CAISM.

4.2 Coleta de material biológico

A casuística utilizada para o presente trabalho consistiu inicialmente de 112 conceitos que evoluíram para o óbito no período perinatal no CAISM - UNICAMP. Seguindo as normas do ECLAMC (1982) bem como aquelas da OMS, foram utilizados, nesse trabalho, os critérios de idade gestacional mínima de 20 semanas completas e/ou peso igual ou superior a

¹ O CAISM participa do programa ECLAMC desde 1987, portanto, para todos os malformados uma ficha padronizada que inclui dados do recém-nascido bem como dados gestacionais, familiares, raciais e de avaliação sócio-econômica é preenchida.

500 g, acrescidos dos óbitos neonatais ocorridos durante os primeiros 28 dias de vida, para definir as perdas gestacionais do período perinatal.

Entre abril de 1996 e abril de 1999 (com intervalo inativo de um ano) foi efetuada a coleta de tecidos fetais dessa casuística para cultura e estudo citogenético. As amostras dos tecidos para as culturas foram coletadas da seguinte forma: sangue de punção cardíaca coletado logo após o óbito do recém-nascido no centro obstétrico ou no berçário pelos médicos plantonistas (em alguns casos a coleta de sangue periférico foi realizada antes do óbito do recém-nascido); cartilagem e pele coletadas pela autora na sala de necrópsia do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

O material para a investigação citogenética consistiu, portanto, dos referidos tecidos: sangue, pele e cartilagem. Antes da necrópsia, as amostras de tecidos, como pele e cartilagem, foram coletadas em condições assépticas e colocadas em frascos estéreis contendo meio de transferência (meio de cultura HAM-F10 ou solução de Hank's acrescida de antibióticos). Nos fetos macerados coletou-se apenas cartilagem, enquanto que, nos fetos não-macerados, os tecidos coletados foram sangue apenas ou sangue e cartilagem ou ainda pele e cartilagem.

4.3 Estudos citogenéticos

Os estudos citogenéticos foram realizados no Laboratório de Procedimentos Especializados do CAISM-UNICAMP (abril/96 – março/97) e no Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP (abril/98 – abril/99).

Para a investigação citogenética, a partir de sangue, utilizamos o protocolo de rotina, o qual consiste na técnica modificada de Moorhead *et al* (1960) e que pode ser descrita como segue.

4.3.1 Obtenção de metáfases a partir do cultivo de linfócitos de sangue periférico.

- a) **Colheita** – Eram colhidos de 2 a 5 ml de sangue por punção cardíaca logo após o óbito, com agulha e seringa descartáveis previamente heparinizadas (cerca de 0,1 ml de heparina), após assepsia local com álcool iodado e álcool 70%.

- b) **Cultura de linfócitos** – Eram adicionadas 18 gotas de sangue total heparinizado a frascos de cultura contendo 5 ml de meio de cultura (HAM-F10 ou RPMI 1641) mais 20% de soro fetal bovino e fitohemaglutinina (20 µg/ml).
- c) Toda a operação era efetuada em câmara asséptica, com material estéril. Os frascos de cultura eram colocados em estufas a 37°C por 72 horas e, 30 minutos antes do término desse período acrescentava-se 0,1 ml de colchicina (0,1 µg/ml) ao meio de cultura. Ao final do período de incubação, os frascos eram retirados da estufa, agitados levemente e seu conteúdo transferido para tubos cônicos, centrifugados por 5 minutos a 900 rpm e retirava-se o sobrenadante.
- d) **Hipotonia** - Foi utilizada solução hipotônica de KCL 0,075M aquecida a 37° C; 5 ml eram acrescentados a cada tubo e, a seguir, o sedimento delicadamente ressuspenso com pipeta Pasteur. Após 30 minutos, a hipotonia era interrompida acrescentando-se 0,5 ml de fixador (metanol/ácido acético 3:1) recém-preparado.
- e) **Fixação** – O material era centrifugado por 5 minutos a 900 rpm e o sobrenadante retirado; o sedimento era ressuspenso e aspirado com a pipeta Pasteur. Colocava-se 4 ml de fixador em cada tubo e gotejava-se delicadamente o conteúdo da pipeta. Novamente o material era ressuspenso e centrifugado a 900 rpm por 5 minutos. Retirava-se o sobrenadante e repetia-se a operação por mais três vezes. Após a última lavagem com o fixador, deixava-se um volume de fixador proporcional ao do sedimento.
- f) **Preparação das lâminas** – As lâminas limpas eram passadas em álcool/éter e enxugadas com papel absorvente. Pingava-se 3 a 4 gotas do material ressuspenso sobre a lâmina levemente inclinada e deixava-se secar à temperatura ambiente.
- g) **Análise cromossômica** – A análise cromossômica foi feita em cromossomos corados pela técnica de obtenção de bandas G (Sanchez *et al*, 1973) descrita a seguir:
- as lâminas eram incubadas em tampão-fosfato (pH=6,8) por no mínimo, 30 minutos.
- Retiradas do tampão-fosfato, escorria-se o excesso do mesmo e corava-se com o corante Whright diluído em tampão-fosfato na proporção de 1:3 (1ml do corante mais 3 ml do tampão-suficientes para uma lâmina) por 3 a 5 minutos.
- Finalmente, as lâminas eram lavadas com água desionizada.

A análise cromossômica foi realizada em 15 metáfases no mínimo. Em caso de suspeita de mosaicismo, o número de células analisadas foi aumentado para 50.

Para a cultura de fibroblastos de pele foi utilizada a técnica do explante que passaremos a descrever.

4.3.2 Obtenção de metáfases a partir do cultivo celular de fibroblastos de pele pela técnica do Explante

A) Estabelecimento da cultura

A.1 – Fragmentos de pele de aproximadamente 5 mm eram coletados em condições assépticas, antes de processar-se a necrópsia dos recém-nascidos, sendo imediatamente colocados em meio de transferência contendo antibiótico.

A.2 – Na câmara asséptica, o pedaço de pele era transferido para uma placa de Petri (6 cm de diâmetro) contendo novo meio de cultura onde era lavado por duas vezes e cortado em cerca de 20 fragmentos menores. Tais fragmentos eram transferidos para tubos de Leighton ou frascos descartáveis (de 25 ml) com o auxílio de uma pipeta Pasteur (cerca de 5 a 6 fragmentos por tubo). Os fragmentos eram apenas umedecidos com o meio (2 a 3 gotas escorridas entre os pedaços).

A.3 – Após 3 dias de incubação a 37° C, acrescentava-se 1 ml de meio de cultura mais soro fetal bovino a 30% aos tubos de cultura que eram mantidos em repouso por mais 10 dias. A partir de então, o meio era trocado a cada três dias, observando as áreas de crescimento celular ao redor do explante inicial com o auxílio do microscópio invertido. Quando as culturas apresentavam um bom crescimento, em um período variável entre 10 a 15 dias após o início das culturas, os tubos eram submetidos a repicagem. Para isso, o meio de cultura neles contido era dispensado, adicionava-se a cada frasco de cultura 1 a 2 ml de tripsina aquecida a 37° C, que era rapidamente dispensada, repetindo-se novamente a mesma operação.

A.4 – Os tubos eram deixados em repouso durante aproximadamente 5 minutos e podia-se raspar o fundo dos frascos de cultura com uma espátula de vidro, quando necessário. A seguir, injetava-se 5 ml de meio de cultura novo quando a repicagem era para o mesmo frasco ou 10 ml se a repicagem fosse para dois frascos descartáveis (1,5 ml e 3 ml respectivamente para os tubos de Leighton). Com a mesma seringa do meio

ressuspendia-se delicadamente o material, retirando-se, se fosse o caso, uma alíquota de 5 ml (ou 1,5 ml) da suspensão celular que eram lançadas em um novo frasco.

A.5 – Após a repicagem, os tubos continuavam a ser observados a cada dois dias e submetidos a troca de meio nesses intervalos. Quando o crescimento celular se revelava satisfatório, mostrando fibroblastos em paliçada cobrindo o fundo do tubo, era feita a preparação cromossômica, ou por vezes, nova repicagem conforme o caso. A presença de células arredondadas constituía bom indicador de que as células estavam com um bom índice mitótico.

B) Preparação cromossômica

B.1 – Adicionava-se colchicina na concentração final de 0,02 µg/ml de cultura, deixando incubar o material a 37° C durante 6 horas.

B.2 – Após a incubação, o meio de cultura contido no frasco de cultura era transferido para um tubo cônico (1,5 ml para o tubo de Leighton e 5 ml para o frasco descartável) de tripsina aquecida a 37° C e era adicionada ao primeiro, para uma rápida lavagem das células. Essa solução era transferida diretamente para o mesmo tubo cônico que recebeu o meio, e nova solução de tripsina adicionada ao frasco de cultura, a qual ficava atuando por um período de 2 a 3 minutos, em estufa a 37° C.

B.3 – Após os 5 minutos iniciais, o frasco de cultura era agitado para que as células se desprendessem do fundo. A intensidade desse procedimento era verificada ao microscópio e se fosse pequena, raspava-se o fundo do tubo com o auxílio de uma espátula de vidro, e prolongava-se um pouco mais o tempo de incubação. Ao final de 10 minutos, o conteúdo do frasco era transferido para o tubo cônico, contendo o meio de cultura mais a solução de tripsina inicialmente retirados.

B.4 – O tubo cônico era centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Desse ponto em diante, o material celular passava a receber o tratamento usualmente empregado no preparo de lâminas para o estudo de metáfases obtidas a partir de cultura de linfócitos, exceto o tempo de hipotonia, onde se utilizava uma variação técnica (hipotonia progressiva) que consistia em acrescentar-se 1 ml de solução de KCL 0,075 M a 37° C ao sedimento, deixando atuar durante 3 minutos em banho-maria (37° C). Em seguida, adicionava-se mais 1 ml a cada 3 minutos até completar 4 ml de solução hipotônica de KCL e o tempo de ação de 12 minutos, ressuspendendo o material a cada acréscimo de solução.

4.3.3 Obtenção de metáfases a partir de cultura de células de cartilagem humana.

A) Estabelecimento da cultura

Utilizou-se uma modificação da técnica descrita por Urioste (1993) para a obtenção de metáfases a partir da cultura de células de cartilagem humana.

Fragmentos de cartilagem da epífise tibial ou femural foram coletadas em condições assépticas dos natimortos e recém-nascidos com óbito neonatal antes da necrópsia. Os fragmentos dos tecidos eram transferidos em frascos de coleta estéreis, contendo meio de transferência composto por solução salina balanceada de Hank's (HBSS) com 50 mg/ml de penicilina.

A metodologia para a cultura de cartilagem teve os seguintes passos:

1. na câmara asséptica, a peça de cartilagem coletada era transferida para uma placa de Petri estéril, de 6 cm de diâmetro, contendo HBSS mais antibiótico e lavada duas vezes nessa solução;
2. o fragmento era transferido a seguir para um tubo de ensaio estéril contendo 1 ml de tripsina aquecida a 37° C, fechado hermeticamente, e incubado durante uma hora em estufa a 37° C;
3. após esse período, o fragmento de cartilagem era retirado da solução de tripsina, lavado em placa de Petri com HBSS e removia-se todo o tecido conectivo. A cartilagem era finamente picada com o auxílio de um bisturi descartável ou com tesoura de pontas finas (iris);
4. o material era transferido, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, para um tubo cônico estéril contendo 2 ml de uma solução de collagenase composta por 6,25 mg de Collagenase (Tipo II, 520 U/mg, Sigma) diluída em 13 ml de HBSS isenta de cálcio e magnésio;
5. os fragmentos de cartilagem eram incubados em estufa a 37° C por um período de 18 a 20 horas;
6. após a incubação, o material era ressuspenso com o auxílio de uma pipeta Pasteur, com 2 ml de tampão-fosfato-salino (PBS Dulbecco's Gibco, UK), centrifugado a 800 rpm por minuto;
7. retirava-se o sobrenadante e acrescentava-se novamente 2 ml de PBS ao sedimento, ressuspensava-se com a pipeta Pasteur, centrifugava-se novamente (800 rpm – 5 minutos), repetia-se a lavagem mais duas vezes;

8. o último sedimento (centrifugado) obtido era ressuspenso em 10 ml de meio de cultura (HAMF-10 e soro fetal bovino a 30%), essa suspensão era distribuída em 2 frascos de cultura descartáveis (5 ml/cada) e incubados a 37° C;

9. quando as células aderiam ao fundo dos frascos de cultura, o que acontecia usualmente após 48 horas, o meio de cultura passava a ser trocado três vezes por semana;

10. as culturas eram, então, observadas diariamente ao microscópio e avaliadas. Quando a cultura primária apresentava um número suficiente de células em divisão, finalizava-se o processo, utilizando-se o método clássico pela adição de colchicina e tripsinização, hipotonia, fixação e preparação das lâminas para análise cromossômica (semelhante ao que foi descrito em 4.3.2.B). Quando o crescimento era lento e os condrócitos já ocupavam mais de 50% do fundo dos frascos, procedia-se a repicagem (conforme descrito em 4.3.2: A.3, A.4 e A.5) até a obtenção de crescimento satisfatório para a retirada das culturas.

4.4 Métodos Estatísticos

4.4.1 Método estatístico para cálculo do tamanho amostral para averiguação de freqüência de aberração cromossômica

Para o cálculo do tamanho de uma amostra representativa, nessa pesquisa de freqüência de aberrações cromossômicas em uma população de óbitos perinatais, utilizamos a fórmula e cálculo abaixo descritos, para amostras aleatórias simples (Richardson *et al*, 1999).

$$n = \frac{\sigma^2 \cdot p \cdot q \cdot N}{E^2 (N-1) + \sigma^2 \cdot p \cdot q}$$

Tamanho da amostra para populações finitas (amostragem aleatória simples).

Onde:

n = tamanho da amostra

σ^2 = nível de confiança escolhido, em números de desvios (sigmas)

p = proporção da característica pesquisada no universo, calculada em porcentagem.

q = proporção do universo que não possui a característica pesquisada ($q = 1 - p$). Em porcentagem: $q = 100 - p$

E^2 = erro de estimação permitido.

N = tamanho da população.

Considerações:

1. O nível de confiança é de 95%, equivalente a 2σ ;
2. a proporção de óbitos devida a aberração cromossômica em população de óbitos perinatais em outros estudos, faz supor uma proporção de $p = 6$, e, portanto, $q = 94$;
3. $E = 5\%$
4. $N = 314$ óbitos perinatais no período estudado.

Cálculo:

$$n = \frac{\sigma^2 \cdot p \cdot q \cdot N}{E^2 (N-1) + \sigma^2 \cdot p \cdot q}$$

$$n = \frac{4 \cdot 6 \cdot 94 \cdot 314}{25 \cdot 313 + 4 \cdot 6 \cdot 94} = \frac{708.384}{10.081} = 70,27 \cong 71$$

$$n \cong 71.$$

Portanto, o tamanho amostral representativo para avaliar frequência de anomalias cromossômicas seria de 71 recém-nascidos aproximadamente, considerando $p = 6\%$.

De abril de 1996 a abril de 1999 (com intermitências) realizou-se o estudo citogenético em uma população total de 112 recém-nascidos que evoluíram para óbito no CAISM-UNICAMP, dos quais cinco foram eliminados da amostra por ocasião da padronização da técnica de cultura de condrócitos, e outros quatro casos foram eliminados, pois, o óbito ocorreu com mais de 28 dias de idade, ficando a amostra final com 103 casos. Desses, 10 eram fetos macerados, 15 fetos não-macerados, e, 78, recém-nascidos que morreram durante os primeiros 28 dias de vida (óbitos neonatais).

Houve 12 casos que, embora as culturas tenham falhado, seus cariótipos foram incluídos no presente estudo para a avaliação das freqüências de anomalias cromossômicas, visto que, tais casos haviam sido submetidos à cordocentese no período pré-natal, e, portanto, já tinham cariótipos conhecidos. Tais casos, contudo, foram considerados como insucesso de cultura na avaliação do índice de sucesso dos cultivos celulares de sangue.

5.1 Avaliação dos dados clínicos da amostra

Dentre os 103 casos incluídos na amostra havia 58 do sexo masculino e 45 do sexo feminino (tabela 5.1).

De acordo com a idade gestacional ao nascimento a distribuição dos 103 recém-nascidos está demonstrada na tabela 5.2. A distribuição dos fetos conforme o peso ao nascimento é mostrada na tabela 5.3.

Tabela 5.1 - Razão de sexo entre natimortos e óbitos neonatais na amostra total

Tipo do Óbito	Sexo		Razão de Sexo
	Masculino	Feminino	
Natimortos	16	9	1,78
Óbitos Neonatais	42	36	1,17
Total	58	45	1,29

$$\chi^2 = 0,79$$

$$P = 0,373$$

Teste Qui-quadrado para proporção não significativo.

Tabela 5.2 - Distribuição dos recém-nascidos de acordo com a idade gestacional na amostra total.

Idade Gestacional (em semanas)	Nº. de recém-nascidos		Total (%)
	NM	ON	
20 a 27	11	18	29 (28,2)
28 a 36	9	42	51 (49,5)
37 e acima	5	18	23 (22,3)
Total	25	78	103 (100)

NM = natimortos

ON = óbitos neonatais

Tabela 5.3 - Distribuição dos fetos de acordo com o peso ao nascimento na amostra total.

Peso (em gramas)	Natimortos Nº.	Óbitos Neonatais Nº.	Total Nº. (%)
500-900	13	21	34 (33)
1000-1500	4	19	23 (22,4)
1600-2000	2	10	12 (11,7)
2100-2500	3	14	17 (16,5)
2600-3000	1	5	6 (5,8)
3100-3500	2	8	10 (9,7)
3600-4000	0	1	1 (0,9)
Total	25	78	103 (100)

A correlação entre idade materna e a distribuição dos recém-nascidos que foram a óbito no período perinatal é mostrada na tabela 5.4 (amostra total).

Tabela 5.4 - Distribuição dos óbitos perinatais correlacionados com a idade materna.

Idade Materna (em anos)	Natimortos N°.	Óbitos Neonatais N°.	Total (%)
Menos de 20	7	15	22 (21,4)
21 a 25	5	27	32 (31,1)
26 a 30	5	24	29 (28,1)
31 a 35	4	8	12 (11,6)
36 a 39	0	4	4 (3,9)
40 e mais	4	0	4 (3,9)
Total	25	78	103 (100)

Entre as causas de óbito perinatal foram diagnosticadas anóxia ante ou intra-natal do feto, tocotraumas, infecções intra-uterinas e/ou exógenas, doenças maternas, malformações e outras, conforme é demonstrado na tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Causas de mortalidade dos recém-nascidos que foram a óbito no período perinatal.

Causa do Óbito	NM	ON	Total	%
Malformação	11	45	56	54,4
Prematuridade	3	12	15	14,6
Doenças maternas	3	5	8	7,8
Anóxia	2	5	7	6,8
Infecção intra-uterina	2	3	5	4,8
Causa indeterminada	2	2	4	3,9
Isoimunização	2	2	4	3,9
Doença da membrana hialina	0	2	2	1,9
Tocotraumatismo	0	1	1	1,0
S. de Stuck Twin (Gemelaridade)	0	1	1	1,0
Total	25	78	103	100

NM= natimortos

ON= óbitos
neonatais

A distribuição das malformações ou defeitos estruturais encontrados nos 56 óbitos perinatais da amostra é mostrada na tabela 5.6. Em 44% dos recém-nascidos no grupo dos natimortos e em 59% dos recém-nascidos no grupo dos óbitos neonatais, pelo menos uma malformação congênita foi encontrada na necrópsia e/ou exame clínico.

Tabela 5.6 - Distribuição das malformações congênitas maiores e menores detectadas no grupo dos malformados e correlacionadas com a época do óbito (intra útero=11 natimortos; neonatal=45 óbitos neonatais).

Malformações	Natimortos		Óbitos neonatais		Total Geral (%)
	N	%	N	%	
Cardiovasculares	2	8,7	10	11,2	12 (10,7)
Pulmonares	1	4,3	10	11,2	11 (9,8)
Sistema nervoso central	8	34,8	20	22,5	28 (25)
Urogenitais	4	17,4	7	7,9	11 (9,8)
Gastro intestinais	1	4,3	7	7,9	8 (7,2)
Outras	7	30,5	35	39,3	42 (37,5)
Total	23	100	89	100	112 (100)

N = N°. de malformações

Com relação à paridade das gestantes, cujos conceitos compuseram a presente casuística, obteve-se os resultados demonstrados na tabela 5.7.

Detectou-se na amostra total 30 gestantes primíparas (33,3%), sendo seis no grupo de natimortos e 24 entre os óbitos neonatais. Nessa categoria também foram encontrados 21 conceitos malformados (três natimortos e 18 óbitos neonatais); 60 gestantes multiparas foram encontradas na casuística total, observando-se entre elas, um gradiente decrescente de freqüências, a partir das que já possuíam um filho até as que possuíam quatro ou mais filhos. O número de malformados seguiu esse mesmo padrão decrescente entre as diversas categorias hierárquicas de paridade.

Tabela 5.7 - Correlação entre a paridade das gestantes e a época do óbito (natimortos e óbitos neonatais). Assinala-se também, entre [], o número de recém-nascidos malformados em cada categoria.

Paridade	Época do óbito		Total (%)
	Intra-útero n° (%)	Neonatal n° (%)	
Primíparas	6 (26,1) [3]	24 (35,8) [18]	30 (33,3) [21]
1 filho	8 (34,8) [5]	15 (22,4) [8]	23 (25,5) [13]
2 filhos	1 (4,3)	14 (20,1) [8]	15 (16,6) [8]
3 filhos	3 (13,0) [1]	8 (11,9) [5]	11 (12,2) [6]
4 ou mais filhos	5 (21,7) [3]	6 (8,9) [3]	11 (12,2) [6]
Total	23 (100) [12]	67 (100) [42]	90 (100) [54]

OBS – Em 13 casos, os dados sobre paridade não foram encontrados nas fichas e/ou prontuários hospitalares

5.2 Características do crescimento das culturas de tecidos fetais dos recém-nascidos que foram a óbito no período perinatal.

Os resultados das culturas de tecidos fetais (condrócitos, fibroblastos de pele e linfócitos de sangue) estão resumidos na tabela 5.8.

Foram incluídos nessa avaliação 103 casos no total; dentre eles, obteve-se sucesso em 73 (70,9%) e houve falha de crescimento em 30 (29,1%). Nestes últimos, nove deles apresentavam material contaminado (cinco amostras de sangue, duas de pele e duas de cartilagem), em outros quatro, o sangue estava coagulado nas seringas e 11 não cresceram por estarem macerados (três amostras de sangue, duas de pele e seis de cartilagem) e seis por motivos desconhecidos. Considerando-se apenas o grupo dos natimortos, não se obteve sucesso em nove casos (três amostras de cartilagem, uma de pele e cinco de sangue), e dentre esses, seis estavam extremamente macerados, com os órgãos autolisados. Nestes, o teste de exclusão pelo Azul Tripan apresentou 0% de viabilidade em quatro casos, sendo que

nos dois restantes, foi de 3 e 12%. Nos casos de sucesso de cultivo celular de cartilagem, tanto de natimortos quanto de óbitos neonatais, o teste revelou sempre viabilidade superior a 90%.

O tempo médio para a primeira retirada das culturas de condrócitos foi de 19 dias e para fibroblastos de pele, de 31 dias. Cariótipos foram obtidos de todas as culturas que obtiveram sucesso, exceto o caso nº 107, cuja cultura, muito pobre, não forneceu metáfases em condições de serem analisadas citogeneticamente.

Tabela 5.8 - Avaliação das taxas de sucesso de cultivo celular nos diferentes tecidos estudados correlacionados à época do óbito dos recém-nascidos .

Época dos Óbitos	Tecidos											
	Cartilagem				Pele				Sangue			
	Total	+	-	IS	Total	+	-	IS	Total	+	-	IS
Natimortos	14	4	10	28,6	10	7	3	70,0	11	3	8	27,3
Óbitos Neonatais	17	12	5	70,6	16	13	3	81,2	63	39	24	61,9
Total Geral	31				26				74			
Índice Geral de Sucesso %				51,6				76,9				56,7

+: sucesso do cultivo celular

-: insucesso do cultivo celular

IS: índice de sucesso

Dentre os 103 casos estudados na casuística do presente trabalho, encontrou-se 56 recém-nascidos malformados e 47 sem defeitos estruturais detectados. No entanto, com cariótipo conhecido, foram 41 malformados e 32 sem anomalias morfológicas, perfazendo um total de 73 recém-nascidos com cariótipo conhecido (tabela 5.9).

Tabela 5.9 - Achados citogenéticos correlacionados com o fenótipo dos recém-nascidos.

Fenótipo	Citogenética		Total
	Cariótipo Normal	Cariótipo anormal (%)	
Normal	31	1 (3,1)	32
Malformado	34	7 (17,1)	41
Total	65	8 (11,0)	73

(%) – Percentual de aberrações cromossômicas.

Na amostra total (103 casos), 58 eram do sexo masculino e 45 do sexo feminino. No entanto, entre os recém-nascidos com cariótipo conhecido 37 eram do sexo masculino e 36 do sexo feminino (tabela 5.10), indicando que houve mais falhas de crescimento nas culturas de fetos masculinos (21 falhas) que nas culturas de fetos femininos (9 falhas). Como mostra a tabela 5.10, a maior parte dos fetos com cariótipo anormal era do sexo feminino.

Tabela 5.10 - Achados citogenéticos correlacionados ao sexo dos recém-nascidos.

Sexo	Cariótipo		Total
	Normal	Anormal	
Masculino	35	2	37
Feminino	30	6	36
Total	65	8	73

A correlação entre os achados citogenéticos e o período do óbito pode ser observada na tabela 5.11. Dos 73 fetos cujos cariótipos são conhecidos, 16 eram natimortos e 57 tiveram óbito pós-natal (óbitos neonatais). A maior parte dos cariótipos anormais ocorreu entre esses últimos (óbitos neonatais) sendo todos eles malformados. Curiosamente, um natimorto (nº. 102) cujo cariótipo era anormal (46,XX/47,XX,+18) não apresentava defeitos estruturais externos segundo observação clínica do prontuário hospitalar. O exame de necrópsia não foi realizado nesse recém-nascido, portanto, a observação clínica encontrada no prontuário diz respeito à impressão do obstetra.

No anexo 1 estão relacionados todos os casos estudados com os respectivos achados fenotípicos e citogenéticos, bem como, a idade gestacional e os tecidos cultivados.

Tabela 5.11 - Achados citogenéticos correlacionados com o período do óbito.

Período do Óbito	Cariótipo		Total
	Normal	Anormal	
Intra-útero (natimorto)	13 (3)	3 (2)	16 (5)
Pós-natal (óbito neonatal)	52 (31)	5 (5)	57 (36)
Total	65 (34)	8 (7)	73 (41)

O número dentro do parênteses indica a quantidade de fetos malformados.

Anomalias cromossômicas foram encontradas em oito óbitos perinatais (11%). No grupo dos natimortos houve três casos de trissomia 18: duas livres (casos de n°.19 e n°.35) e um caso de mosaico (n°. 102); esses três natimortos eram macerados. As causas de óbito dos natimortos (casos n°. 19 e n°. 35) foram as malformações múltiplas típicas da síndrome de Edwards verificadas em ambos, exame clínico e necrópsia. No caso n°. 102, a ausência do exame de autópsia impossibilitou uma melhor avaliação do fenótipo. Entre os óbitos neonatais houve dois casos de trissomia 21, cujos recém-nascidos apresentavam anomalias cardíacas graves (cardiomegalia, comunicação interventricular e intra-atrial-caso n°. 10) e hidronefrose bilateral grave, rins policísticos (caso n°. 60). Nesse grupo de óbitos neonatais tivemos ainda três casos de trissomia 18 (n°. 33, n°. 109, n°. 110), dois eram trissomias livres e um deles (n°. 109) era mosaico (com linhagens 47,XX,+18/48,XX,+18,+mar). As principais malformações detectadas nesses casos foram: caso n°. 33 – malformações múltiplas típicas da síndrome; caso 109: anencefalia e polidrâmnio; no caso n°. 110: malformações torácicas com ectopia cardíaca e polidrâmnio.

A tabela 5.12 relaciona os tipos e as freqüências das aberrações cromossômicas encontradas na amostra com o sexo dos recém-nascidos (óbitos perinatais).

Tabela 5.12 - Incidência e tipos de aberrações cromossômicas na amostra relacionados com o sexo do recém-nascido.

Tipo de Aberração	N°. de casos			%
	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>Total</i>	
Trissomia 18 (livre)	1	3	4	5,5
Trissomia 21	1	1	2	2,7
Mosaicos Trissomia 18		2	2	2,7
Total	2	6	8	11,0

M = Masculino
F = Feminino

A tabela 5.13 resume os dados referentes à idade gestacional, peso ao nascimento, idades materna e paterna, principais defeitos congênitos e achados citogenéticos encontrados nos oito casos de óbitos perinatais portadores de cariótipos anormais.

Tabela 5.13 - Correlação entre os achados citogenéticos, idade gestacional, peso ao nascimento, idades materna e paterna e principais defeitos congênitos encontrados entre os óbitos perinatais com cariótipos anormais.

Nº. Casos	Cariótipo	IG	P (g)	IM	IP	Fenótipo externo	MFs internas
10	47,XX,+ 21	31	2300	26	27	Cardiomegalia, comunicação interventricular e inter-atrial, membros encurtados, prega única plantar e palmar, macroglaxia, hipotonia cervical, fenda palpebral oblíqua, prega espicântica bilateral, clinodactilia de 5º dedo.	Cardiomegalia com CIA e CIV
19 ^a . (NM)	47, XX,+ 18	29	1390	18	21	Occipito proeminente, orelhas malformadas, hipertelorismo, protusão ocular leve, nariz pequeno, bulboso, filtro curto, prega palmar única, camptodactilia na mão E, sindactilia nos pés. Micro-retrognatia.	Coarctação pré-ductal da aorta
33	47, XX,+ 18	28	550	43	39	Occipito proeminente, orelhas malformadas, olhos protusos, micro-retrognatia, face triangular, palato ogival, camptodactilia e clinodactilia, calcâneo proeminente, sindactilia nos pés, clitoromegalia, onze pares de costelas muito finas, clavícula longa.	Sem autópsia
35 (NM)	47, XX,+ 18	26	970	43	43	Occipito proeminente, face triangular, leve retrognatismo, fendas palpebrais horizontalizadas, leve protusão ocular, palato alto, baixa implantação de orelhas, camptodactilia, calcâneo proeminente bilateral, clitoromegalia. Cisto de plexo coróide à E.	Sem MFs internas
60	47, XY,+ 21	35	2480	29	32	Hidropsia + dismorfismo típico da síndrome de Down.	Hidronefrose bilateral, válvula de uretra posterior, rins policísticos, PCA.
102 ^a . (NM)	46, XX / 47, XX,+ 18	20	520	17		Não descrito	Sem autópsia.
109	47, XX,+ 18 / 48, XX,+ 18, + mar	38	1760	36	42	Anencefalia, olhos protusos, orelhas com baixa implantação, palato ogival, raiz nasal alta, camptodactilia de dedos das mãos, hipoplasia de unhas, pés eqüinos, rigidez de quadril.	Atrofia de adrenais.
110	47, XY,+ 18	22	720	29	22	Defeito de parede tóraco-abdominal, agenesia de esterno, ectopia cardíaca, macrocrania, dismorfismo facial, fenda lábio-palatina, microtia, pescoço curto, espinha bífida, agenesia de rádio, pés tortos.	Hidrocefalia por estenose do aqueduto, agenesia de pericárdio, divertículo de Meckel, pâncreas extópico e hipoplasia pulmonar.

a = Macerado; IG = Idade Gestacional; P = Peso; IM = Idade Materna; IP = Idade Paterna;
MFs = Malformações

5. RESULTADOS

6 – DISCUSSÃO

6.1 Avaliação de alguns dados clínicos na casuística total que constituem fatores de risco na mortalidade perinatal.

6.1.1 Sexo do recém-nascido

Verificou-se, entre os natimortos, uma razão sexual de 1,78 (0,89), ou seja, encontramos na amostra 64% de natimortos do sexo masculino e 36% do sexo feminino, enquanto que, entre os óbitos neonatais a razão de sexo foi de 1,17 (0,58) sendo 53,8% do sexo masculino e 46,2% do sexo feminino, diferença esta não significativa entre esses grupos (Tabela 5.1).

A influência dessa variável sobre a mortalidade perinatal ainda é bastante controversa na literatura. Alguns autores, estudando populações de natimortos, não detectaram diferenças significativas em relação ao sexo, pois aproximavam-se de 1 (0,50) (Naeye *et al*, 1971; Hovatta *et al*, 1983). Entretanto, Gadow *et al* (1991) constataram que 54% dos natimortos eram do sexo masculino; Jakobovits *et al* (1987) e Menezes *et al* (1998) verificaram também que em suas amostras de natimortos, os fetos masculinos excederam, de forma significativa, os femininos. As causas prováveis dessas diferenças foram apontadas por vários autores. Padbury *et al* (1981) descreveram o retardo da maturação pulmonar e da região medular das glândulas supra-renais como fatores que aumentam a susceptibilidade do feto masculino à morbidade neonatal e ao “distress” respiratório. Para MacGillivray & Davey (1985), o fator predisponente consistiria na produção de hormônios masculinos pelo feto, acarretando um desequilíbrio nas taxas de progesterona e estrógenos maternos e induzindo o útero a um trabalho de parto precoce. Outro fator apontado consiste em um menor desenvolvimento imunológico dos fetos masculinos, que os predisporia a mais freqüentes infecções do líquido amniótico, aumentando a incidência de ruptura precoce da bolsa amniótica. (MacGillivray & Davey, 1985).

No grupo dos óbitos neonatais, embora menor, a razão de sexo foi 1,17 (0,58); essa predominância do sexo masculino, observada em nossa amostra, é concordante com os dados encontrados na literatura (Padbury *et al*, 1981; MacGillivray *et al*, 1985; Jakobovits *et al*, 1985; Menezes *et al*, 1998); os óbitos do sexo masculino também foram mais freqüentes no grupo dos malformados numa razão de 1,20 (0,60).

Entre os óbitos perinatais cromossomicamente anormais, no entanto, houve predominância do sexo feminino numa razão de 1:5, possivelmente, pela maior

incidência da trissomia 18 em mulheres, fato claramente observado em nossa amostra, e bem conhecido na literatura (Thompson & Thompson, 1991; Baty *et al*, 1994).

6.1.2 Idade Gestacional

Em nosso estudo, encontramos 87 recém-nascidos (84,4%) na amostra total, com idade gestacional inferior a 37 semanas (incluindo os natimortos e óbitos neonatais).

A idade gestacional foi calculada de acordo com a data da última menstruação relatada pela mãe na maioria dos casos, ou então, pelos exames ultra-sonográficos ou de Capurro. Como a idade gestacional não é um dado de fácil obtenção, muitos autores preferem utilizar o peso ao nascimento como fator de risco primário para a mortalidade perinatal.

A idade gestacional é considerada por muitos pesquisadores dos países desenvolvidos, como um fator de risco importante, que pode influenciar primariamente a mortalidade perinatal. Verloove-Vanhorick *et al* (1986) estudaram uma população de 1.338 recém-nascidos prematuros com idade gestacional inferior a 32 semanas e/ou peso ao nascimento muito baixo (inferior a 1500g) nascidas na Holanda (1983), encontraram uma taxa de mortalidade neonatal de 233 por mil, e, concluíram que a idade gestacional, cuidadosamente calculada com base no último período menstrual, exames de ultra-sonografia e testes de gravidez, foi o fator determinante mais importante dentre os demais (inclusive o peso ao nascimento) na sobrevivência desses neonatos.

Wilcox & Skjerven (1992) em estudo retrospectivo na Noruega, em uma população de 413.051 recém-nascidos, procuraram estabelecer a importância da idade gestacional e correlacioná-la com o peso ao nascimento relativo à cada faixa de idade gestacional e à possibilidade de sobrevivência no período perinatal. Verificaram que a idade gestacional é um fator primordial que determina o peso ao nascimento e conseqüentemente a sobrevivência nesse período. Na realidade, segundo Balcazar & Haas (1991), essas duas variáveis são bastante interdependentes; o grupo de recém-nascidos de baixo peso é muito heterogêneo, e constituído por dois subgrupos: o primeiro, pelos recém-nascidos prematuros com idade gestacional inferior a 37 semanas completas, e, o segundo, pelos recém-nascidos de termo que apresentam retardo de

crescimento intra-útero, considerados pequenos para sua idade gestacional (PIG) e cujo peso é inferior ao percentil 10 na tabela referente à sua idade gestacional.

6.1.3 Peso ao nascimento

Já é bem conhecida a forte associação entre baixo peso ao nascimento e mortalidade não só no período perinatal como também no infantil (Barros & Victoria, 1991; Lofredo & Simões, 1990).

Segundo a OMS (1981), o peso ao nascimento constitui o fator mais importante na predição das chances de sobrevivência, crescimento e desenvolvimento normal de um recém-nascido; por essa razão, decidiu incluir entre os demais indicadores de qualidade do atendimento pré-natal e perinatal de uma região ou país, a taxa de redução de nascimentos de recém-nascidos de baixo peso.

Observamos em nossa amostra total que 83,6% dos recém-nascidos apresentavam peso igual ou menor que 2500 g (recém-nascidos de baixo peso), e, dentre esses, 55,4% apresentavam peso igual ou menor que 1500g (recém-nascidos de peso muito baixo) (Tabela 5.3).

No grupo dos natimortos, tivemos 96% de fetos com peso igual ou menor que 2500 g, e desses, 68% tinham peso igual ou menor que 1500 g. Entre os óbitos neonatais, 80% apresentaram peso baixo ao nascer (< 2500 g), desses 65% eram de peso muito baixo (< 1500 g) e somente 20% tinham peso normal (> 2500 g). Diversos autores relataram altas taxas de baixo peso entre os óbitos perinatais (Laurenti *et al*, 1984; Moraes *et al*, 1984; Costa *et al*, 1987; Gadow *et al*, 1991; Gomes & Santo, 1997; Maia, 1996; Forssas *et al*, 1998; Betiol *et al*, 1998; Menezes *et al*, 1998; Cernach, 1996). Segundo MacCormick (1985), no período neonatal os bebês de baixo peso (< 2500 g) têm cerca de 40 vezes mais chances de evoluir para óbito, e os bebês de peso muito baixo (< 1500 g), cerca de 200 vezes mais do que os recém-nascidos com peso normal. Dollfus *et al* (1990) encontraram valores semelhantes em seus trabalhos, com um risco relativo de mortalidade de 44 vezes para os bebês de baixo peso e 196 vezes para os de peso muito baixo em relação aos de peso normal.

O baixo peso ao nascimento pode ser influenciado por numerosos fatores: doenças maternas, principalmente, infecções e hipertensão arterial, condições obstétricas, pequeno número (ou ausência) de consultas pré-natais, e, inclusive pode

ser reflexo das condições culturais da gestante e sócio-econômicas familiares (Dollfus *et al*, 1990; Barros *et al*, 1984; Maia, 1997; Gomes & Santo, 1997; Betiol *et al*, 1998).

No presente trabalho o índice de baixo peso ao nascimento é bastante elevado, e isso poderia ser explicado pelo fato que, a grande maioria das mães que são atendidas no CAISM-UNICAMP possui o 1º grau incompleto, e provêm de camadas sócio-econômicas desfavorecidas, onde a má nutrição e um número razoável de gestantes adolescentes aliado à falta de informações sobre os cuidados e assistência pré-natais constituem fatores predisponentes ao nascimento de bebês com baixo peso. O número elevado de crianças malformadas na amostra também concorreu para esse índice, uma vez que, o baixo peso ao nascimento em portadores de anomalias congênitas é referido por diversos autores (Goulet *et al*, 1986; Dollfus *et al*, 1990; Cernach, 1996).

6.1.4 Idade Materna

Em diversos países, tanto desenvolvidos como em desenvolvimento, numerosos pesquisadores referem a idade materna como fator de risco importante na mortalidade perinatal. Eles observaram coeficientes de mortalidade mais elevados nas faixas etárias de gestantes com idade inferior a 20 anos e superior a 35 anos (Laurenti *et al*, 1975; Victora *et al*, 1982; Omene *et al*, 1984; Barros *et al*, 1984; Laurenti & Buchala, 1985; Nazer *et al*, 1989; Dollfus *et al*, 1990; Gadow *et al*, 1991; Hassold, 1995; Hofvendahi, 1995; Griffin *et al*, 1996; Cernach, 1996; Richardus *et al*, 1997; Gomes & Santo, 1997; Maia, 1997; Menezes *et al*, 1998; Betiol *et al*, 1998; Caron *et al*, 1999). Segundo esses autores, as duas faixas etárias extremas concentram uma maior incidência de aberrações cromossômicas, especialmente as aneuploidias (basicamente as trissomias autossômicas), e inclusive de perdas gestacionais (abortamentos e óbitos perinatais) por outras causas, tais como: prematuridade e condições correlatas, peso muito baixo ao nascimento, doenças maternas agudas e/ou crônicas, taxa aumentada de gemelaridade, alta paridade e baixas condições sócio-econômicas e culturais da gestante e família.

Observou-se, na amostra total, que 80,6% das gestantes apresentaram idade igual ou inferior a 30 anos, sendo que 21,4% dos óbitos perinatais ocorreu em gestantes na faixa etária inferior a 20 anos. Nesse último grupo encontrou-se dois casos de anomalias cromossômicas (o nº. 19 e o nº. 102) ambos com trissomia 18; as demais causas de óbito foram: oito casos de malformações graves, cinco casos de

prematuridade e condições correlatas, três de gemelaridade, um de edema pulmonar agudo e um de infecção intra-uterina. No grupo de gestantes com mais de 35 anos, os óbitos perinatais corresponderam a 7,8% do total e encontrou-se também três casos de recém-nascidos citogeneticamente anormais: os casos de n°. 33, 35 e 109, todos com trissomia 18. Os demais óbitos nesse grupo ocorreram devido a malformações graves (dois casos), prematuridade, anóxia, infecção intra-uterina e causa indeterminada com um caso cada.

O maior índice de mortalidade no presente trabalho foi detectado na faixa etária de 21 a 30 anos (59,2%), onde foram encontrados três casos de aberração cromossômica (n°. 10 e n°. 60 – trissomia 21; n°. 110 trissomia 18); os demais óbitos ocorreram devido às causas já citadas, principalmente a malformações congênitas graves afetando sistema nervoso, cardiovascular e renal, prematuridade e condições correlatas (baixo peso, “*distress*” respiratório, entre outras).

6.1.5 Causas de óbito

A análise dos dados da tabela 5.5 evidencia as malformações congênitas (54,4% - sendo de 50% entre os natimortos e 55,5% entre os óbitos neonatais) como a principal causa de óbito perinatal na população estudada, especialmente as que afetam o sistema nervoso central (principalmente defeitos de fechamento do tubo neural), o sistema digestivo (onfalocele, gastrosquise, hérnia diafragmática), o sistema urinário (agenesia renal, rins policísticos, hidronefrose), as cardiopatias, o sistema respiratório (agenesia e hipoplasia pulmonar) e as malformações múltiplas, em particular, aquelas típicas das síndromes de Edwards e Down.

Em estudos mais antigos realizados nos países desenvolvidos, as taxas de malformações congênitas situam-se em torno de 20 a 30% entre os óbitos perinatais, (MacILwaine *et al*, 1979 – 26%, Mutch *et al*, 1976 – 34%; Young & Clarke, 1987 – 13,6% [excluídos os defeitos de fechamento do tubo neural]; Dollfus *et al*, 1990 – 17,4%). Com a crescente melhoria nos serviços de saúde desses países, principalmente, quanto aos cuidados pré e perinatais, houve um declínio acentuado na mortalidade perinatal e isso deve-se à redução do número de casos de óbito por prematuridade e doenças infecciosas (Kalter, 1991). Em contrapartida, as taxas de óbitos perinatais causados por malformações congênitas não têm diminuído substancialmente, pelo contrário, tendem a tornar-se relativamente mais importantes, à medida que vão sendo controladas outras

causas de mortalidade perinatal passíveis de prevenção. Galan-Roosen *et al* (1998) em estudo prospectivo na Holanda, sobre a contribuição das malformações congênitas na mortalidade perinatal, detectou uma incidência geral de 33% de malformações congênitas no grupo de óbitos perinatais; malformações congênitas letais foram encontradas em 51% dos casos de natimortos e em 70% dos casos de óbitos neonatais. Malformações congênitas afetando o sistema nervoso central foram mais freqüentes entre os natimortos (45%), e, os defeitos cardiovasculares e pulmonares foram mais freqüentes entre os óbitos neonatais (27% e 33% respectivamente).

Nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, e mesmo em estudos nacionais, essas taxas de malformações congênitas, em geral, são mais baixas, variando de 2 a 6% entre os natimortos e de 6 a 15% entre os óbitos neonatais (Laurenti *et al*, 1975; Saad, 1986; Zucoloto *et al*, 1988; Brenelli, 1989; Brenelli *et al*, 1992). Cernach (1996), pesquisando anomalias congênitas e mortalidade perinatal em dois hospitais na cidade de São Paulo, encontrou valores em torno de 8% entre os natimortos e uma freqüência mais elevada entre os óbitos neonatais – 19,6%. Gomes & Santo (1997) detectaram uma freqüência geral de 23% de anomalias congênitas em uma amostra de óbitos perinatais em Presidente Prudente (SP).

Como se pode verificar, na presente casuística, houve um viés, não intencional, visto que a maior parte das coletas de sangue foram feitas por médicos do serviço de Neonatologia. Embora houvesse sido feita uma solicitação insistente de coleta de sangue aleatória de todos os óbitos perinatais (fossem eles malformados ou não), infelizmente houve um direcionamento tendencioso na coleta de amostras de sangue dos malformados. Como a grande maioria das amostras consistiu em sangue de punção cardíaca (85) tivemos esse viés. Quanto à coleta de amostras de pele e cartilagem (26 e 31 respectivamente), foi realizada de forma totalmente aleatória pela autora, não havendo tendenciosidade na coleta de material para as culturas celulares de longa duração. Outro dado que convém lembrar é que o CAISM-UNICAMP, por ser um hospital de referência na região, drena muitos casos de malformações congênitas detectados em exames pré-natais de gestações que estavam sendo acompanhadas em outros centros.

A segunda causa mais freqüente de óbito perinatal na amostra total foi prematuridade (14,6%) seguida por doenças maternas (7,8%) e anóxia (6,8%). Juntas, essas três causas foram responsáveis por 30% dos óbitos perinatais ocorridos no

período do estudo. Entre os estudos nacionais destacamos os realizados na UNICAMP por Brenelli *et al* (1992) que encontrou como principais causas de óbito perinatal: a asfixia (27,5%), membrana hialina (19,8%) e infecções (18,7%). Cernach (1996) detectou em seu trabalho a prematuridade como causa primeira de óbitos perinatais (50,5%) seguida por asfixia (31,3%) e infecção (3,6%). Em países desenvolvidos, a prematuridade constitui uma causa de óbito perinatal importante, cuja frequência é variável, situando-se, em geral, entre 20 – 30% (Dollfus *et al*, 1990; Coard *et al*, 1991); pode, no entanto, alcançar valores mais baixos (Galan-Roosen *et al*, 1998 – 7%).

A prematuridade, a segunda causa mais importante de óbitos perinatais em nossa amostra (14,6%), pode ser um bom indicativo da deterioração das condições sócio-econômicas das gestantes atendidas pelo CAISM-UNICAMP; ultimamente torna-se cada vez mais evidente o aumento crescente das desigualdades sociais, mais marcantes no atual momento sócio-econômico-político do país.

Quanto aos óbitos por anóxia (6,8%), a taxa é considerada semelhante àquelas encontradas em países desenvolvidos, onde os óbitos por asfixia apresentam taxas inferiores a 10%. De Wals *et al* (1989) detectaram, na Bélgica, essa causa de óbito perinatal em 6,2% dos casos estudados; Dollfus *et al* (1990) nos USA encontrou 3,4% e Galan-Roosen *et al* (1998) em 7,8%.

Como causas de óbito menos freqüentes tivemos: isoimunização (3,9%), doença da membrana hialina (1,9%), tocotraumatismo (1%) e os de causa indeterminada (3,9%). Consideramos que os óbitos por isoimunização poderiam ter sido evitados com medidas de prevenção adequadas e utilizadas oportunamente; os casos de membrana hialina (2) e tocotraumatismo (1) registrados são insuficientes para serem relacionados à qualidade da assistência perinatal. Nos quatro casos de “causa de óbito indeterminada” a ausência de exame necroscópico e/ou clínico e os registros de dados nos prontuários clínicos insuficientes não permitiram o diagnóstico da causa primária do óbito. Quanto à gemelaridade, houve seis casos de nascimentos de gemelares, em um caso verificou-se como causa *mortis* a síndrome de Stuck-Twin; nos demais, o óbito foi associado à prematuridade e/ou malformações, e um caso devido à doença materna aguda (pneumonia).

6.1.6 Paridade

Diversos trabalhos relataram a correlação entre paridade, ocorrência de malformações congênitas e perdas gestacionais (Granadillo *et al*, 1981; Cifuentes *et al*, 1989; Menezes *et al*, 1998). Outros autores, porém, relacionaram esses fatos com idade materna avançada (Nazer *et al*, 1978; Bugnon *et al*, 1980, Caron *et al*, 1999), Nazer *et al* (1978) observaram ainda que as malformações congênitas correlacionam-se mais freqüentemente a casos de subfertilidade materna e concluíram que mães de crianças malformadas eram, em geral, múltiparas e que o intervalo de tempo entre o último nativo e o filho malformado era maior devido a uma maior dificuldade de conceber e a um maior número de perdas gestacionais prévias (Nazer *et al*, 1975; Matsunaga & Shiota, 1980). Outros autores descreveram a associação entre paridade e alguns tipos específicos de defeitos congênitos estruturais; segundo eles, os defeitos de fechamento de tubo neural seriam mais freqüentes nas primíparas, enquanto que, entre as múltiparas seriam as cardiopatias (Anderson *et al*, 1958; Bugnon *et al*, 1980).

No presente estudo, verificou-se que a maior freqüência, tanto entre os natimortos entre os óbitos neonatais, ocorreu na categoria das primíparas; a partir daí, houve um decréscimo de freqüências à medida que aumentou o número de gestações prévias.

Outros trabalhos também observaram uma maior freqüência de óbitos perinatais entre as primigestas; Tovar *et al* (1988), em pesquisa sobre óbitos intra-uterinos demonstraram que 62% de natimortos de sua amostra eram de mães primíparas, e, Gadow *et al* (1991), relataram também que entre as primíparas, o número de natimortos é mais elevado, declina nas secundíparas, e, nas categorias hierarquizadas subseqüentes, volta a elevar-se a freqüência à medida em que aumenta o número de gestações anteriores.

Observou-se ainda que as malformações afetando o sistema nervoso central distribuíram-se de modo equivalente entre primíparas e múltiparas, bem como, as que afetam o sistema cardiovascular, digestivo, genito-urinário e as malformações múltiplas. Em relação a outras causas de óbito não verificamos diferenças importantes entre primíparas e múltiparas.

6.2 Técnicas de cultivo celular

O estudo citogenético em tecidos de natimortos e óbitos neonatais propõe, em geral, um problema sério ao citogeneticista: a escolha do tecido fetal mais adequado à investigação de anomalias cromossômicas, especialmente quando se trata de fetos macerados.

Vários tecidos humanos têm sido utilizados com esse objetivo, apresentando, no entanto, diferentes taxas de sucesso. Estudos citogenéticos a partir de cartilagem humana já haviam sido descrito anteriormente em natimortos e óbitos neonatais. Chen *et al* (1980) obtiveram preparações cromossômicas de excelente qualidade a partir de cartilagem humana de um paciente com a síndrome de Majewsky (displasia esquelética caracterizada por costelas curtas e polidactilia). Esses autores utilizaram uma técnica de explante, no qual necessitavam de uma ou duas subculturas até obter um bom índice mitótico para análise cromossômica e sugeriram que cartilagem poderia ser uma boa opção na escolha de tecido pós-morte para culturas cromossômicas, uma vez que, os condrócitos permanecem viáveis por um longo tempo após a morte.

Urioste (1993) sugeriu que culturas de cartilagem, utilizando-se o método de dissociação celular pela collagenase baseado em Gray & Gollin (1987), não necessitariam de subculturas, e que rapidamente permitiriam a obtenção de bons resultados citogenéticos: cariótipos de casos nos quais as culturas de outros tecidos do mesmo paciente tratados com métodos diferentes não obtiveram sucesso. No trabalho de Urioste (1993), a taxa de sucesso com as culturas de cartilagem foi de 62,5% no grupo de natimortos e 100% no grupo de óbitos neonatais.

Em trabalho mais recente realizado por Gelman-Kohan *et al* (1996), foram comparadas as taxas de sucesso de cultivo celular entre diferentes tecidos de diferentes produtos de perdas gestacionais. Os resultados desse trabalho mostraram os seguintes índices de sucesso: cartilagem de óbitos fetais intra-uterinos – 33,3%; tecidos de abortos espontâneos – 37,5% e material de aborto eletivo – 87,5%.

O presente estudo, utilizando técnica de Urioste (1993) modificada, demonstrou que condrócitos obtidos a partir de cartilagem da epífise femural ou tibial ou da junção condrocostal de natimortos e óbitos neonatais podem crescer bem em cultura, que a análise cromossômica é possível. A técnica é relativamente simples e preparações cromossômicas de boa qualidade podem ser obtidas (Fig. 1 e 2). O intervalo de tempo entre o início e o término das culturas foi, em média, de 21 dias.

A taxa de sucesso das culturas de cartilagem dos natimortos nesse trabalho (28,6%), considerada relativamente baixa, pode ser atribuída ao tempo muito longo, transcorrido entre o óbito intra-uterino e o nascimento, o que dificultou a obtenção de amostras de cartilagem com células viáveis. Verificou-se nos prontuários hospitalares e fichas clínicas dos natimortos e suas mães, que esse tempo foi em média de cinco dias e, em alguns casos, igual a nove dias, o que acarretou intensa maceração e autólise dos tecidos fetais. Utilizando cartilagem dos óbitos neonatais, no entanto, a taxa de sucesso das culturas (70,6%) foi comparável às de pele (81,2%) e sangue (61,9%).

Concluiu-se nesse estudo que, efetivamente, a cartilagem não se revelou o tecido ideal para o estudo citogenético de fetos macerados, uma vez que não obtivemos crescimento positivo em nenhum caso desses devido à extrema maceração, autólise dos tecidos fetais e viabilidade celular muito baixa ou nula. Entretanto, podemos considerar a cultura de cartilagem, uma técnica complementar de análise cromossômica, particularmente, quando não há outros tecidos disponíveis, e mesmo nos casos de maceração fetal leve a moderada, em que não tenha ocorrido ainda autólise dos tecidos.

Culturas de condrócitos epifisais de fetos humanos também têm sido utilizadas em investigações moleculares de diversos tipos de displasias esqueléticas letais como, por exemplo, a displasia tanatofórica (Brenner *et al*, 1996), nos estudos de expressão gênica cartilagem-específica, de mutações nos genes que codificam os componentes da matriz extracelular cartilagem-específicos, a estrutura e a função da cartilagem (Reginato *et al*, 1994; Muir, 1995).

6.3 Frequências e tipos de aberrações cromossômicas entre os recém-nascidos que evoluíram para óbito no período perinatal.

No grupo de fetos macerados (óbitos intra-útero) de quatro casos estudados citogeneticamente, três casos (75%) apresentaram anomalias cromossômicas (síndrome de Edwards).

Entre os óbitos pós-natais (até 28 dias após o nascimento), 57 casos foram analisados citogeneticamente e encontrou-se cinco deles portadores de aberrações cromossômicas, dois com trissomia do 21 e três com trissomia do 18.

Dentre os cinco natimortos malformados e cariotipados, três (60%), apresentavam anomalias cromossômicas, enquanto que, entre os óbitos neonatais, dos 36 casos cariotipados, cinco (13,9%) deles tinham aberração cromossômica. Observa-se, então, que entre os recém-

nascidos malformados com cariótipo conhecido, a frequência de aberração cromossômica entre os natimortos é cerca de quatro vezes maior do que entre os óbitos neonatais.

Considerando-se os óbitos perinatais prematuros (com idade gestacional inferior ou igual a 37 semanas) encontramos entre os natimortos 25% de portadores de cariótipos anormais e entre os óbitos neonatais 10,4%.

A frequência de anomalias cromossômicas detectada na população de fetos malformados foi de 17,1%, e entre os não-malformados foi de 3,1%, enquanto que na casuística total foi de 11%, ou seja, oito casos sendo três natimortos. O exame citogenético foi realizado com sucesso em 70,9% do total de casos. À primeira vista, essa frequência de 11% parece ser elevada, se comparada àquelas encontradas em trabalhos clássicos mais antigos da literatura, onde situa-se em torno de 6% em populações de óbitos perinatais (Bauld *et al*, 1974 e Sutherland *et al*, 1974 – 6,4%; Kuleshov, 1976 – 6,9%; Sutherland & Carter, 1983 – 6,7%; Angell *et al*, 1984 – 5,3%; Smith *et al*, 1990 – 7,1%).

Trabalhos com amostras de malformados mais recentemente publicados, relatam frequências um pouco mais elevadas (Wilson *et al*, 1992 – 23%, Cernach, 1996 – 16%; Talabani *et al*, 1998 – 19%; Galan-Roosen *et al*, 1998 – 20%).

Os resultados do presente trabalho são, no entanto, justificáveis pelas seguintes razões:

1) o CAISM – UNICAMP é um hospital de referência na região de Campinas – SP: para ele são drenados numerosos casos de malformações detectadas em gestações que estão sendo acompanhadas em outros centros;

2) em nossa casuística tivemos um grande número de fetos malformados (54,4%), devido, em parte, a uma coleta de material tendenciosa. Como nesse grupo, a incidência de aberrações cromossômicas geralmente é mais alta do que entre os fetos fenotipicamente normais, esse fato certamente provocou uma elevação dessa frequência em nossa amostra.

Os defeitos congênitos mais frequentemente associados às cromossomopatias detectados na população em estudo foram: cardiopatias, hidrocefalia, anencefalia, hidropsia fetal, hidronefrose, retardo de crescimento intra-uterino e outros achados associados especificamente às síndromes de Edwards e de Down. Um caso de trissomia 18 apresentava um defeito raro: agenesia de esterno com ectopia “cordis” (caso nº.110).

Os natimortos representaram 24,3% da casuística (25/103) e anomalias cromossômicas foram encontradas em três deles correspondendo a 18,7% do total de casos de natimortos estudados citogeneticamente. Desses três casos, dois eram fetos macerados; em dois obteve-se sucesso com cultura de linfócitos de sangue, e em um deles, a cultura de condrócitos não

obteve crescimento positivo devido ao alto grau de maceração fetal ao nascimento e o cariótipo já havia sido determinado por cordocentese. Comparando-se os dados publicados na literatura, observa-se que foram encontradas taxas de aberrações cromossômicas variando de 9,5 a 15,1% entre os natimortos macerados (Angell *et al*, 1984; Machen, 1974; Kuleshov, 1976; Sutherland & Carter, 1983; Cernach, 1996). Em todos os estudos com culturas de tecidos de natimortos, as taxas de sucesso na obtenção de resultados cariotípicos positivos são considerados muito baixas situando-se ao redor de 18% (Machin, 1974; Angell *et al*, 1984) e isso deve-se à dificuldade de crescimento dos tecidos dos natimortos macerados. No presente trabalho, essa taxa de sucesso no grupo dos natimortos macerados foi de 22%. Essas diferenças nos resultados provavelmente refletem diferenças metodológicas laboratoriais, ou, até mesmo, na seleção da amostra. Ressalte-se ainda que, Aymé *et al* (1985), recomendaram o exame citogenético em todos os natimortos, e especialmente nos macerados (Angell *et al*, 1984; Urioste, 1993), uma vez que, o exame clínico pode ser prejudicado pelo estado de maceração fetal, a incidência de aberrações cromossômicas é mais elevada nesse grupo, e ainda, um número razoável de anomalias cromossômicas pode não se expressar como malformações maiores, principalmente quando em mosaico (como, por exemplo, o caso n°. 102). Nas populações de óbitos perinatais, as aberrações cromossômicas, categorizadas como causas desses óbitos, apresentam incidência bastante variada nos diversos estudos publicados. Dessa forma, estudos mais antigos relatam freqüências de 4 a 8% (Gustavson & Jorulf, 1976; Kuleshov, 1976; Hassold *et al*, 1980; Kaji *et al*, 1980; Kalter & Warkany, 1983; Nicolaiades *et al*, 1992); outros autores, freqüências ao redor de 13 a 14% (Machin, 1974 e 1975; Pierquin *et al*, 1985; Aymé *et al*, 1985). Trabalhos mais recentes, com populações de óbitos perinatais malformados, descrevem taxas um pouco mais elevadas, variando de 18 a 33% (Wilson *et al* 1992; Cernach, 1996; Talabani *et al*, 1998; Galan-Roosen *et al*, 1998).

Entre os óbitos neonatais portadores de malformações graves com cariótipo conhecido, nossa taxa de aberrações cromossômicas foi de 17,1% (7/41), situando-se, portanto, dentro dessa escala de variações encontrada na literatura.

A distribuição dos tipos de aberrações cromossômicas está em conformidade com o esperado, isto é, os cariótipos anormais encontrados foram as trissomias (100%) e, dentre elas, a trissomia 18 foi o achado mais freqüente (75%) seguida pela trissomia 21 (25%) (Tabela 5.11). A trissomia 18, também de acordo com o esperado (1 : 4, segundo Baty *et al*, 1994), foi mais freqüente entre os recém-nascidos do sexo feminino, numa proporção de 1 : 5; na trissomia 21, a razão de sexo encontrada foi 1 : 1, enquanto que, os dados da literatura indicam

uma maior proporção esperada de propósitos do sexo masculino entre os portadores da trissomia 21 (1, 21 : 1) (Huether, 1990).

Outros tipos de anomalias cromossômicas, menos freqüentes e descritas na literatura, não foram detectadas na presente casuística, possivelmente, por ser ela relativamente pequena, e a freqüência das mesmas também ser baixa nas populações de óbitos perinatais.

7 - CONCLUSÕES

A análise dos resultados do presente trabalho permitiram extrair as seguintes conclusões:

- 7.1** a cultura de cartilagem humana revelou-se ineficaz para estudos citogenéticos a partir de tecidos fetais macerados. Por outro lado, a cultura de condrócitos pode ser utilizada como método complementar quando outros tecidos fetais não estiverem disponíveis, por razões diversas, para o estudo cariotípico;
- 7.2** o tecido que apresentou melhores resultados foi a pele;
- 7.3** a frequência geral de aberrações cromossômicas foi de 11%, sendo de 18,7% entre os natimortos e 8,8% entre os óbitos neonatais; 17,1% entre os recém-nascidos malformados e 3,1% entre os não malformados;
- 7.4** a alta frequência de aberrações cromossômicas nessa amostra foi considerada, ao menos em parte, decorrente de um viés de amostragem - coleta de sangue preferencial de fetos malformados;
- 7.5** a avaliação de alguns dados clínicos dessa amostra permitiu observar que a presente população foi formada: predominantemente por fetos do sexo masculino, porém com predomínio do sexo feminino entre os fetos com cariótipos anormais; a maioria dos fetos apresentava uma idade gestacional entre 28 e 35 semanas, pesavam entre 500 e 1.500 g e 80% das idades maternas foram iguais ou inferiores a 30 anos; 54,4% dos fetos dessa amostra eram portadores de defeitos congênitos, e os principais defeitos estruturais acometiam os sistemas nervoso e urinário.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRUZZO, M.A. & HASSOLD, T.J. - Etiology of nondisjunction in humans. **Envir Mol Mutag** 26:38-47, 1995.
- ADINOLFI, M.; CROLLA, J. - Non-isotopic in situ hybridisation. Clinical cytogenetics and gene application. **Adv Hum Genet** 22:187-256, 1994
- ADINOLFI, M.; PERTL, B.; SHERLOCK, J. - Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. **Pren Diagn** 17:13:1299-1311, 1997.
- ALBERMAN, E.D.; CREASY, M.R. - Frequency of chromosomal abnormalities in miscarriages and perinatal deaths. **J Med Genet** 14:313-315, 1977.
- ANDERSON, W.J.R.; BAIRD, D.; THOMPSON, A.M. - Epidemiology of stillbirths and infants deaths due to congenital malformation. **Lancet** 1:1305-1306, 1958.
- ANGELL, R.R.; SANDISON, A.; BAIN, A.D. - Chromosome variation in perinatal mortality: A survey of 500 cases. **J Med Genet** 21:39-44, 1984.
- AYMÉ, S.; JULIAN, C.; MAURIN, N.; GAMBARELLI, D.; SUDAN, N. - Registre des morts-nés des Bouches-du-Thoné: Bilan de trois ans de fonctionnement. **J Génét Hum** 33:265-274, 1985.
- BALCAZAR, H. & HAAS, J.D. - Retarded fetal growth patherns and early neonatal mortality in a Mexico City population. **Bull Pan Am Health Organ** 25:55-63, 1991.
- BARROS, F.C.; VICTORA, C.G.; GRANZOTO, J.A.; VAUGHAN, J.P.; LEMOS, J.R.A.V. - Saúde Perinatal em Pelotas, RS, Brasil. Fatores sociais e biológicos. **Rev Saúde Publ** 18:301-312, 1984.

- BARROS, F.C.; VICTORA, C.G.; VAUGHAN, J.P. - Causas de mortalidade perinatal em Pelotas, RS, Brasil: utilização de uma classificação simplificada. **Rev Saúde Publ** 21:310-316, 1987.
- BARROS, F.C. & VICTORA, C.G. - **Epidemiologia da Saúde Infantil**. São Paulo. HUCITEC-UNICEF, 1991.
- BATY, B.J.; BLACK BURN, B.L.; CAREY, J.C. - Natural history of trisomy 18 and medical histories, survival and recurrence risks. **Am J Med Genet** 49:175-188, 1994.
- BAULD, R.; SUTHERLAND, G.R. & BAIN, A.D. - Chromosome studies in the investigations of stillbirths and neonatal deaths. **Archs Dis Child** 49:782-788, 1974.
- BEISCHER, N.A. - Major fetal malformations and perinatal mortality rates: the place of late terminations. **Aust NZ J Obstet gynaecol** 35:1-2, 1995.
- BETIOL, H.; BARBIERI, M.A.; GOMES, V.A.; ANDREA, M.; GOLDANI, M.Z.; RIBEIRO E R.O. - Saúde Perinatal: metodologia e características da população estudada. **Rev Saúde Publ** 32:18-28, 1998.
- BOUÉ, J.G. & BOUÉ, A. - Les aberrations chromossomiques dans les avortements spontanés humains. **La Presse Medicale** 78: 635-641, 1970.
- BOUÉ, J.; BOUÉ, A.; LAZAR, P. - Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. **Teratology** 12:11-26, 1975.

BOUÉ, A.; BOUÉ, J. & GROOP, A. - Cytogenetics of pregnancy wastage. **Adv Genet** 15:1-57, 1985.

BOUÉ, A. - **Médecine Prénatale – Biologie Clinique du Foetus.** Médecine-Sciences Flammarion et C^{ie}, éditeurs.Paris,1989. 290 p.

BRANDIFF, B.; GORDON, L.; ASHWORTH, L. *et al* - Chromosomes of human sperm: variability among normal individuals. **Hum Genet** 70:18, 1985.

BRENELLI, M.A. – Estudo epidemiológico da distribuição de peso, idade gestacional e da mortalidade neonatal da população de nascidos vivos de duas maternidades da cidade de Campinas. Campinas, SP, 1989. (Tese – Doutorado – Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP)

BRENELLI, M.A.; ALTEMANI, A.M.; MARTINS FILHO, J. - Causas básicas de morte neonatal. **J Ped** 68:305-, 1992.

BRENNER, R.E., NERLICH, A.; TERINDE, R.; BARTMANN, P. - In vitro studies on clonal growth of chondrocytes in thanalophoric dysplasia. **Am J Med Genet** 63:401-405, 1996.

BUGNON, P.; NIVELON-CHEVALLIER, A.; MAVEL, A.; MILAN, C.; MICHIELS, Y.; PORTIER H. – Contribution à l'étude des malformations congénitales. **J Gyn Biol Reprod** 9:405-412, 1980.

CARR, D.H. - Chromosomes and abortion. **Adv Genet** 2:201-257, 1971.

CARON, L.; TIHY, F.; DALLAIRE, L. - Frequencies of chromosomal abnormalities at amniocentesis: over 20 years of cytogenetic analyses in one laboratory. **Am J Med Genet** 82:149-154, 1999.

CASSIDY, S.B.; LAI, L.W.; ERICKSON, R.P.; MAGNOSON, L.; THOMAS, E.; GENDRON, R.; HERMAN, N.J. - Trisomy 15 with loss of the paternal 15 as a cause of Prader-Willi syndrome due to maternal disomy. **Am J Hum Genet** 51:701-708, 1992.

CAVALCANTI, D.P. - Estudo cromossômico em abortos espontâneos e suas correlações com dados bioquímicos e anátomo-patológicos. Campinas, SP, 1990. (Tese – Doutorado- Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP)

CASTILLA, E.E.; ORIOLI, I.M. - On monitoring the multiply malformed infant, I: case-finding, case-recording, and data handling in a Latin American Program. **Am J Med Genet** 22:717-725, 1985.

CIFUENTES, L.; NAZER, J.; CATALAN, J.; PARADA, L. RUIZ, G. – Malformaciones congênitas: un modelo predictivo baseado en factores de riesgo. **Rev Med Chile** 117:611-617, 1989.

CERNACH, M.C. - Mortalidade perinatal e anomalias congênitas: estudo retrospectivo de freqüências e fatores de risco e prospectivo anátomo-patológico. São Paulo, 1996. (Tese – Doutorado – Universidade Federal do Estado de São Paulo)

CHEN, H.; CHENG, W.Y.U; MULHER, N. R.; FOWLER, M.; AL SAADY -Chromosome preparations of chondrocytes cultured from human cartilages. **Am J Med Genet** 6:179-181, 1980.

COARD, K.; CODRINGTON, G.; ESCOFFREY, C.; KEELING, J.W.; ASHLEY, D.; GOLDING, J. – Perinatal Mortality in Jamaica 1986-1987. **Acta Paediatr Scand** 80:749-755, 1991.

- CORNEL, M.C.; DE WALLE, H.E.K.; HAVEMAN, T.M. - Birth prevalence of over 30 congenital anomalies in the northern Netherlands. **Ned Tijdschr Genees Kd** 135:2032-2036, 1991.
- COSTA, C.F.F.; DIAS, M.L.C.M.; COSTA, H.L.F.F.; PAGNOSSIAN, G.; ELDORF, M.F.C. - Peso do nascituro e mortalidade neonatal precoce. **Rev IMIP** 1:141-144, 1987.
- COSTA, E.C. - Anomalias congênitas: freqüências e fatores de risco em uma amostra de 39.295 nativos. São Paulo, 1993. (Tese - Mestrado – Escola Paulista de Medicina)
- CREASY, M.R.; CROLLA, J.A. & ALBERMAN, E.D. - A cytogenetic study of human spontaneous abortions using banding techniques. **Hum Genet** 31:177-196, 1976.
- CZULMAN, A.E. - Chromosomal aberrations in spontaneous human abortions. **N Engl J Med** 272:811. 1965.
- DERON, C.; VLIETINCH, R.; DERON, R.; BOKLAGE, C.; THIERY, M. & VAN DEN BERGHE, H. - Genotyping Of Macerated Stillborn Fetuses. **Am J Obstet Gynecol** 164:797-800, 1991.
- DE WALS, P.; BERTRAND, F.; VERLIDE, M.; BECKERS, R. – Perinatal mortality in Belgium. **Biol Neonate** 55:10-18, 1989.
- DOLLFUS, C.; PATETTA, M.; SIEGEL, E. & CROSS, A.W. - Infant mortality: a practical approach to the analysis of the leading causes of death and risk factors. **Pediat** 86:176-183, 1990.
- EDMONDS, D.K.; LINDSAY, K.S.; MILLER, J.F.; WILLIAMSON, E.; WOOD, P.J. – Early embrionic mortality in women. **Fertil Steril** 38:447-453, 1982.

EIBEN, B.; BARTELS, J.; BAHR-PORCH, S.; BORGMAN, S.; GATZS, G.; GELLERT, G.; GOEBEL, R.; HAMMANS, W.; HENTEMANN, M.; OSMERS, R.; RAUSKOLB, R.; HANSMANN, I. - Cytogenetic 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** 47:565-663, 1990.

ELLIS, P.M. & BAIN, A.D. - Cytogenetics in the evaluation of perinatal death. **Lancet** 1:630-631, 1984.

EVANS, H.J. - Chromosome anomalies among livebirths. **J Med Genet** 14: 309-312, 1977.

FERRAZ, E.M. & GRAY, R.H. - A case-control study of stillbirths in Northeast Brazil. **Int J Obstet Gynaecol** 34:13-19, 1990.

FORSSAS, E.; GISSLER, M.; HEMMINKI, E. - Declining perinatal mortality in Finland between 1987 and 1994: contribution of different subgroups. **Eur J Obstet Gynecol** 80:177-181, 1998.

FRYNS, J.P.; VAN DE KERKHOVE, A.; GODDERIS, P.; VAN DE BERGHE, H. - Unusually long survival in a case of full triploidy of maternal origin. **Hum Genet** 38:147-155, 1977.

FRYNS, J.P.; BUGGENHOUT, G.V. - Structural chromosome rearrangements in couples with recurrent fetal wastage. **Eur J Obstet Gynecol Repr Biol** 81:171-176, 1998.

GADOW, E.C.; CASTILLA, E.E.; CAMELO, J.L.; QUEENAN, J.T. - Stillbirth rate and associated risk factors among 869,750 Latin American hospital births 1982-1986. **Int J Gynecol Obstet** 35:209-214, 1991.

GALAN-ROOSEN, A.E.M.; KUIJPERS, J.C.; MEERSHOER, A.P.J.; VAN VELZEN, D. - Contribution of congenital malformations to perinatal mortality. A 10 years prospective regional study in the Netherlands. **Eur J Obstet Gynecol** 80:55-61, 1998.

GARTNER, A.B.; BARRET, I.J.; KALOUSEK, D.K. - Confined placental mosaicism in spontaneous abortions. **Am J Hum Genet** 43:130, 1988.

GELMAN-KOAN, Z.; ROSENSAFT, J.; BEM-HUR, H.; HABER, A.; CHEMKE, J. - Cytogenetic analysis of fetal chondrocytes: a comparative study. **Pren Diagn** 16:165-168, 1996.

GOLDENBERG, R.L.; HUMPHEY, J.L. - Lethal congenital anomalies as a cause of birth-weight specific neonatal mortality. **J Am Med Assoc** 250:513-515, 1983.

GOLDING, J. - The epidemiology of perinatal deaths. In: KIELEY M. - **Reproductive and Perinatal Epidemiology**. CRC Press, Boca Raton, 1991.

GOMES, J.O.; SANTO, A.H. - Mortalidade infantil em município da região Centro-Oeste Paulista, Brasil, 1990 a 1992. **Rev Saúde Publ** 31:330-341, 1997.

GOULET, O.; HOCHEZ, J.; BERCHEL, C.; GOULET, V.; FEINGOLD, J.; BOIS, E. - Incidence des malformations congénitales à la naissance dans une maternité guadalou-péene. **Arch Fr Pediatr** 43:507-511, 1986.

- GRANADILLO, C.L.; SALCEDO, M.N.; ORTIZ, M.S.; ALEZARD, L. – Incidence de enfermedades genéticas y malformaciones congénitas em 5134 historias de autopsias de recién nacidos y mortinatos. **Rev Obstet Ginecol Venezuela** 41:15-22, 1981.
- GRAY, B.A. & GOLLIN, S.M. - Rapid cell culture procedure for tissue samples. **Am J Med Genet** 28:521-526, 1987.
- GRIFFIN, D.K. – The incidence, origin, and etiology of aneuploidy. **Int Rev Cytol** 167:263-296, 1996
- GRIFFIN, D.K.; ABRUZZO, M.A.; MILLIE, E.A.; HASSOLD, T.J. – Sex ratio in normal and disomic sperm: Evidence that the extra chromosome 21 preferentially segregates with the Y chromosome. **Am J Hum Genet**, 59:1108-1113, 1996.
- GRIFFIN, D.K.; MILLIE, E.A.; REDLINE, R.W.; HASSOLD, T.J.; ZARAGOZA, M.V. - Cytogenetic analysis of spontaneous abortions: comparison of techniques and assessment of the incidence of confined placental mosaicism. **Am J Med Genet** 72:297-301, 1997.
- GROUCHY, J.; TURLEAU, C. - **Clinical Atlas of Human Chromosomes**. 2. ed. John Wiley & Sons, New York, 1984.
- GUSTAVSON, K.H. & JORULF, H. - Recurrence risks in a consecutive series of congenitally malformed children dying in the perinatal period. **Clin Genet** 9:307-314, 1976.
- HADDAD, B.R.; SHOROCK, E.; MECK, J.; COWANJ; YOUNG, H.; FERGUSON-SMITH, M.A.; DU MANOIR, S.; RIED, T. - Identification of de novo chromosomal markers and derivatives by spectral karyotyping. **Hum Genet** 103:619-625, 1998.

HAGLUND, B.; CNATTINGIUS, S.; NORDSTROM, M.L. - Social differences in late fetal deaths and infant mortality in Sweeden 1985-86. **Paediatr Perinat Epidemiol** 7:33-44, 1993.

HASSOLD, T. - A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions. **Am J Hum Genet** 32:623-730, 1980 a.

HASSOLD, T.; CHEN, N.; FUNKHOUSER, J.; JOOSS, T.; MANUEL, B.; MATSUURA, J.; MATSUYAMA, A.; WILSON, C.; YAMANE, J.A.; JACOBS, P.A. - A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. **Am J Hum Genet** 31:633-730, 1980.

HASSOLD, T. & JACOBS, P.A. - Trisomy in man. **Ann Rev Genet** 6:555-565, 1984.

HASSOLD, T.J. - Chromosome abnormalities in human reproductive wastage. **Trends Genet** 2:105-110, 1986.

HASSOLD, T.; BENHAM, F. & LEPPERT, M. - Cytogenetic and molecular analisys of sex-chromosome monosomy. **Am J Hum Genet** 42:534-541, 1988.

HASSOLD, T. & SHERMAN, S. - The origin of nondisjunction in humans. In: SUMMER H.T.; CHANDLEY A.C. - **Chromosome today**. London. Chapman and Hall, pp 313-322, 1993.

HASSOLD, T.; ABRUZZO, M.; ADKINS, K.; GRIFFIN, D.; MERILL, M.; MILLIE, E.; SAKER, D.; SHEN, J.; ZARAGOZA, M. - Human aneuploidy: incidence origin and etiology. **Envirom Mol Mutagen** 28:167-175, 1996.

HOOK, EB. & CROSS, P.K. - Paternal age and Down's syndromes genotypes diagnosed prenatally: No association in New York state data. **Hum Genet** 62:167-174, 1982.

HOSHI, N.; YAMAGAMI, Y.; HANATANI, K.; TANAKA, T.; FUJIMOTO, S. - Chromosomal studies on 934 induced abortuses of middle-aged pregnant women. **Asia Oceania J Obstet Gynaecol** 16:275-281, 1990.

HOSHI, N.; HATTORI, R.; HANATANI, K.; ORUYAMA, K.; YAMADA, H.; KISHIDA, T.; YAMADA, T.; SAGAWA, T.; SUMIOSHI, Y.; SEIICHIRO, F. - Recent trends in the prevalence of Down syndrome in Japan, 1980-1997. **Am J Med Genet** 84:340-345, 1999.

HOVATTA, O.; LIPASTI, A.; RAPOLA, J.; KARJA-LINEN, O. - Causes of stillbirth a clinicalpathological study of 243 patients. **Br J Obstet Gynaecol** 90:691-696, 1983.

HUETHER, C.A. - Epidemiologic aspects of Down Syndrome: Sex ratio, incidence, and recent impact of prenatal diagnosis. **Issues Rev in Teratol** 5:283-316, 1990.

HWA, H.L.; TSENG, L.H.; HO, H.N.; KO, T.M. - Cytogenetic study of spontaneous abortions with the giemsa banding method. **J Formos Med Assoc** 93:855-8, 1994.

JACBSON, C.B.; BARTER, R.A. - Some cytogenetic aspects of habitual abortion. **Am J Obstet Gynaecol** 97:666, 1967.

JACOBS, P.A. - Mutation rates of structural chromosome rearrangements in man. **Am J Hum Genet** 33:44-54, 1981.

- JACOBS, P.A. - Chromosome abnormalities: comparative epidemiology in abortions and livebirths. ABSTRACTS OF THE 7TH INTERNACIONAL CONGRESS OF HUMAN GENETICS. Berlim, 1986.
- JAKOBOVITS, A.; JAKOBOVITS, A.A.; VISKI, A. - Sex ratio of the stillborn fetuses and neonates dying in the first week. **Early Hum Dev** **15**:131-135, 1987.
- JOBANPUTRA, V.; KRIPLANI, A.; CHOUDHRY, V.P.; KUCHERIA, K. - Detection of chromosomal abnormalities using fluorescence in situ hybridization (FISH). **Natl Med J India** **11**:259-263, 1998.
- KAJII, T.; FERRIER, A.; NIIKAWA, N.; TAKAHARA, H.; OHAMA, K.; AVIRACHAN, S. - Anatomia and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses. **Hum Genet** **55**:87-98, 1980.
- KALOUSEK, D.K.; DILL, F.J. - Chromosomal mosaicism confined to the placenta in human conceptions. **Science** **221**:665-667, 1983.
- KALOUSEK, D.K.; BARRET, I.J.; MC GILLIVRAY, B.C. - Placental mosaicism and intrauterine survival of trisomies 13 and 18. **Am J Hum Genet** **44**:338-343, 1989.
- KALOUSEK, D.K.; BARRET, I.J.; GARTNER, A.B. - Spontaneous abortion and confined placental mosaicism. **Hum Genet** **88**:642-646, 1992.
- KALTER, H. & WARKANY, J. - Congenital malformations etiologic factors and their role in prevention. **N Engl J Med** **308**:424-431, 1983.

KALTER, H. - Five-decade international trends in the relation of perinatal mortality and congenital malformation: stillbirth and neonatal death compared. **Int J. Epidemiol** **20**:173-179, 1991.

KLINGER, K.; LANDES, G.; SHOOK, D.; HARVEY, R.; LOPEZ, B.; HOUSEAL, T.; PAVELKA, K.; DACKOWSKI, W. - Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH). **Am J Hum Genet** **51**:55-65, 1992.

KULESHOV, N.P. - Chromosome anomalies of infants dying during the perinatal period and premature newborn. **Hum Genet** **31**:151-160, 1976.

KUO, V.L.; TENJIN, H.; SEGREBES, R.; PINKEL, D.; GOLBUS, M.S.; GRAY, J. - Detection of aneuploidy involving chromosome 13, 18 or 21 with fluorescence in situ hybridization (FISH) to interphase or metaphase amniocytes. **Am J Med Genet** **49**:112-119, 1991.

LAURENTI, R. - Fatores de erros na mensuração da mortalidade infantil. **Rev Saúde Publ** **9**:529-537, 1975.

LAURENTI, R.; SILVEIRA, M.H.; SIQUEIRA, A.A.F. - Mortalidade perinatal em São Paulo, Brasil. **Rev Saúde Publ** **9**:115-124, 1975.

LAURENTI, R. - Saúde Perinatal. **Rev Saúde Publ** **18**:267-268, 1984.

LAURENTI, R.; BUCHALLA, C.M.; COSTA JR, M.L. - Estudo da morbidade e da mortalidade perinatal em maternidades. I. Descrição do projeto e resultados gerais. **Rev Saúde Publ** **18**:436-447, 1984.

LAURENTI, R.; BUCHALLA, C.M. - Estudo da morbidade e da mortalidade perinatal em maternidades. II. Mortalidade perinatal segundo peso ao nascer, idade materna, assistência pré-natal e hábito de fumar da mãe. **Rev Saúde Publ** 19:225-232, 1985.

LE BEAU, M.M. - In: DE VITA; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. - **Important Advances in Oncology**. Eds Lippincott, Philadelphia, 1993. p. 29-45.

LESTOU, V.S.; KALOUSEK, D.K. - Confined placental mosaicism and intrauterine fetal growth. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed** 79:223-226, 1998.

LOFFREDO, L.C.M.; SIMÕES, M.J.S. - Peso ao nascer e padrões de atendimento ao parto em município do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Saúde Publ** 24:80-83, 1990.

MACCABE, E.R.B.; TOWBIN, J.A.; VAN DEN ENGH, G.; TRASH, B. J. - Xp21 contiguous gene syndromes: deletion quantitation with bivariate flow karyotyping allows mapping of patient breakpoints. **Am J. Hum Genet** 51:1277-1285, 1992.

MAC GILLIVRAY, I. & DAVEY, D.A. - The influence of fetal sex on rupture of the membranes and preterm labor. **Am J Obstet Gynaecol** 153:814-815, 1985.

MACHIN, G.A. - Chromosome abnormality and perinatal death. **Lancet** i: 549-551, 1974.

MACHIN, G.A. & CROLLA, J.A. - Chromosome constitution of 500 infants dying during the perinatal period. **Hum Genet** 23:183-198, 1974.

MACLEOD, P.M.; DILL, F. & HARDWICK, D.F. - Chromosomes, Syndromes, and Perinatal Deaths: The Genetic Counseling Value of a Making A Diagnosis in a Malformed Abortus, Stillborn, and Deceased Newborn. **Birth Defects: Original Article Series, Volume XV, Number 5a**:105-101, 1979.

MAIA, M.A.C. - Características dos nascidos vivos hospitalares no primeiro ano de implantação do Subsistema de Informação sobre Nascidos Vivos, em município de Minas Gerais, Brasil, 1996. **Rev Saúde Publ** 31:581-585, 1997.

MARTIN, N.J.; STEINBERG, B.G. - The dup (3) (p 25 - pterm) syndrome: A case with holoprosencephaly. **Am J Med Genet** 14:767-772, 1983.

MARTIN, R.H.; BALKAN, W.; BURNS, K.; RADEMAKER, A.W.; RUDD, N.L. - The chromosome constitution of 1000 human spermatozoa. **Hum Genet** 63:305-309, 1983.

MARTIN, N.J. - Holoprosencephaly. **Aust Paed J.** 21:306, 1985.

MARTIN, R.H.; RADMAKER, A.W. - The effect of age on the frequency of sperm chromosomal abnormalities in normal men. **Am J Hum Genet** 41:484-492, 1987.

MC CORNICK, M. - The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity. **N Engl J Med** 312:82-90, 1985.

- MATSUMOTO, T.; KONDOH, T.; YOSHIMOTO, M.; FUJIEDA, K.; MATSUURA, N.; MATSUDA, I.; MÜKE, T.; YANO, K.; OKUNO, A.; AOKI, Y.; MURANO, I.; TOYOTA, S.; OHNISHI, S.; NÜKAWA, N. - Complex glycerol kinase deficiency: molecular - genetic, cytogenetic and clinical studies of five japanese patients. **Am J Med Genet** 31:603-616, 1988.
- MATSUNAGA, E.L.; SHIOTA, K. - Search for maternal factors associated with malformed human embryos: a prospective study. **Teratology** 21:323-331, 1980.
- MCILWAINE, G.M.; HOWAT, R.C.L.; DUNN, F.; MACNAUGHTON, M.C. - The Scottish perinatal mortality survey. **Br Med J** ii:1103-1106, 1979.
- MENEZES, A.M.B.; BARROS, F.C.; VICTORA, C.G.; TOMASI, E.; HALPERN, R.; OLIVEIRA, A.I.B. - Fatores de risco para mortalidade perinatal em Pelotas, RS, 1993. **Rev Saúde Publ** 12:209-216, 1998.
- MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. - Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp Cell Res** 20:613-616, 1960.
- MORAIS, E.N.; RESENER, E.V.; MOTTECY, C.S.; ALVES, A.C.; BOSSEMEYER, R.P. - Fatores determinantes nas variações das taxas de mortalidade perinatal. **J Bras Ginec** 94:81-85, 1984.
- MUIR, H. - The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. **Bio Essays** 17:1039-1048, 1995.

- MUTCH, L.M.M.; BROWN, N.J.; SPEIDEL, B.D.; DUNN, P.M. - Perinatal mortality and neonatal survival in Avon. **Br Med J** 1981; **282**:119-122, 1976.
- NAEYE, R.L.; BURT, L.S.; WRIGHT, D.L.; BLANC, W.A.; TATTER, D. - Neonatal mortality the male disadvantage. **Pediatrics** **48**:902-906, 1971.
- NAEYE, R.L. - The epidemiology of perinatal mortality: the power of the autopsy. **Ped Clin N Am** **19**:295-310, 1972.
- NAEYE, R.L. - Causes of perinatal mortality in the US collaborative perinatal project. **JAMA** **238**:228-229, 1977.
- NAEYE, R.L. - The investigation of perinatal deaths. **N Engl J Med** **309**:611-612. 1983.
- NAEYE, R.L. & FRIEDMAN, E.A. - Causes of perinatal deaths associated with gestacional hypertension and proteinuria. **Am J Obstet Gynaecol** **133**:8-10. 1979.
- NAEYE, R.L. & FRIEDMAN, E.A. - Causes of perinatal deaths associated with gestacional hypertension and proteinuria. **Am J Obstet Gynaecol** **133**:8-10, 1979.
- NAZER, J.; CIFUENTES, L.; CATALÁN, J.; PIZARRO, M.T.; RUIZ, G.; PARADA, L. - Incidencia de malformaciones congénitas em mortinatos. **Rev Chil Pediatr** **60**:208-211, 1989.
- NAZER, J.; CIFUENTES, L.; RUIZ, G.; PIZARRO, M.T. - Eddad materna como fator de resgo para malformaciones congénitas. **Rev Med Chile** **122**:299-303, 1994.

NICOLAIDES, K.H.; SNIDJERS, R.J.M.; GOSDEN, C.M.; BERRY, C.; CAMPBELL, S. – Ultrasonographically detectable markers of fetal chromosomal abnormalities. **Lancet** 340:704-707, 1992.

OHNO, M.; MAEDA, T. & MATSUNOBU, A. – A cytogenetic study of spontaneous abortions with direct analysis of chorionic villi. **Obstet Gynecol** 77:394-8, 1991.

OMENE, J.A.; OKOLO, A.A.; IMOEDEHME, D.; OMU, A. - Trends in perinatal mortality rates at the University of Benin Teaching Hospital. **Nigeria East Afr Med J** 61:461-469, 1984.

OPTIZ, J.M. - Prevalência de distúrbios condicionados geneticamente. In: _____ - **Tópicos Recentes de Genética Clínica**. Ribeirão Preto, SP. Gráfica e Editora FCA, 1984. p.25-35.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS - Recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. **Acta Obstet Gynaecol Scand** 56:247-253, 1977.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (1980). Manual de classificação estatística internacional das doenças, lesões e causas de óbito. 9ª rev. São Paulo, Centro OMS para Classificação de Doenças em Português, 1980.

PADBURY, J.F.; HOBEL, C.J.; LAM, R.W.; FISHER, D.A. - Sex differences in lung and adrenal neuro sympathetic development in rabbits. **Am J Obstet Gynaecol** 141:199-204, 1981.

- PAULI, R.M.; REISER, C.A.; LEBOVITZ, R.M.; KIRKPATRICK, S.J. - Wiscosin Stillbirth Service Program:I. Establishment and Assessment of a Community-Based program for Etiologic Investigation of Intrauterine Deaths. **Am J Med Genet** 50:116-134, 1994.
- PAULI, R.M.; REISER, C.A. - Wiscosin Stillbirth Service Program; II. Analysis of Diagnoses and Diagnostic Categories in the First 1,000 Referrals. **Am J Med Genet** 50:135-153, 1994.
- PANDYA, P.P.; KUHN, P.; BRIZOT, M.; CARDY, D.I.; NICOLAIDES, K.H. - Rapid detection of chromosome aneuploidies in fetal blood and chorionic villi by fluorescence in situ hybridisation. **Br J Obstet Gynaecol** 101:493-497, 1994.
- PELLER, S. - Proper delineation of the neonatal period in perinatal mortality. **Am J Publ Health** 55:1005-1011, 1965.
- PELLESTOR, F.; SELE, B.; RAYMOND, L. - Human oocytes chromosome analysis. **Am J Hum Genet** 45 (Suppl): A104, 1989.
- PETITTI, D.B. - The epidemiology of fetal death. **Clin Obstet Gynaecol** 30:253-258, 1987.
- PIERQUIN, G. & DODINVAL, P. - L'autopsie foetale ou néonatale et le conseil génétique. **J Génét Hum** 33:275-281, 1985.
- PENROSE, L.S.; SMITH, G.F. - **Down's anomaly**. London: Churchill. 1966 p 167-171.
- REGINATO, A.M.; IOZZO, R.V.; JIMENEZ, A.S. - Formation of nodular structures resembling mature articular cartilage in long-term primary cultures of human fetal epiphyseal chondrocytes on a hidrogel substrate. **Arthritis Rheum** 37:1338-1349, 1994.

- REDDY, K.S.; SULCOVA, V.; YOUNG, H.; BLANCATO, J.K.; HADDAD, B.R. - De novo mosaic add (3) characterized to be trisomy 14q31 – qter using spectral karyotyping and subtelomeric probes. **Am J Med Genet** 82:318-321, 1999.
- RICHARDSON, R.J.; PERES, J.A.S.; WANDERLEY, J.C.V.; CORREIA, L.M.; PERES, M.H.M. - **Pesquisa Social – Métodos e Técnicas**. São Paulo (SP). Ed Atlas AS., 1999.
- RICHARDUS, J.H.; GRAAFMANS, W.C.; VAN DER PAL-DE-BRUIN; AMELINK-VERBURG, M.P.; VERLOOVE-VANHORICK, P.S.; MACKENBACH, J.P. - An European concerted action investigation the validity of perinatal mortality as an outcome indicator for the quality of antenatal and perinatal care. **J Perinat Med** 25:313-324, 1997.
- SAAD, P.M. - Mortalidade infantil por causas no Estado de São Paulo (Brasil) em 1983; análise sob a perspectiva das causas múltiplas de morte. **Rev Saúde Publ** 20:481-488, 1986.
- SANCHEZ, O.; ESCOBAR, J.I.; YUNIS, J.J. - A simple G. banding technique. **Lancet** 2:269, 1973.
- SHEPARD, T.H.; FANTEL, A.G. - Embryonic and early fetal losses. **Clin Perinatol** 6:219-243, 1979.
- SHORT, R.V. - When a conception fails to become a pregnancy in Maternal recognition of Pregnancy - **Excerpta Medica**. Amsterdam, 1979. pp. 377-387.

- SLAGEL, D.D.; BROMLEY, C.M.; BENDA, J.A. - Detection of chromosomal abnormalities in the dysmorphic fetus using Fluorescence In Situ Hybridization : evaluation for monosomy X genotype. **Hum Pathol** 26:1241-1244, 1995.
- SCHINZEL, A. - **Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man**. Berlin. New York: Walter de Gruyter, 1984.
- SCHRÖCK, E.; MANOIR, S.; VELDMAN, T.; SCHOELL, B.; WIENBERG, J.; FERGUSON-SMITH, M.A.; NING, Y.; LEDBETTER, D.H.; BAR-AM, I.; SOENKSEN, D.; GARINI, Y.; RIED, T. - Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. **Science** 273:494-497, 1996.
- SMITH, A.; BANNATYNE, P.; RUSSEL, P.; ELWOOD, D.; DEN DULK, G. - Cytogenetic studies in perinatal deaths. **Aust NZ J Obstet Gynaecol** 30:206-210, 1990.
- STEVENSON, R.E – The Genetic Basis of Human Anomalies. In: STEVENSON, R.E.; HALL, J.G.; GOODMAN, R.M. - **Human Malformations and related anomalies**. Oxford Monographs on Medical Genetics, 1993. Vol 27. p 115-135.
- SUTHERLAND, G.R.; CARTER, R.F.; BAULD; SMITH, I.I. & BAIN, A.D. - Chromosome studies at the paediatric necropsy. **Ann Hum Genet** 42:173 Londres, Great Britain, 1978.
- SUTHERLAND, G.R. & CARTER, R.F. - Cytogenetic studies: an essential part of the paediatric necropsy. **J Clin Pathol** 36:140-142, 1983.
- THERMAN, E. & SUSMAN, M.- **Human cromossomes structure, behavior, effects**. Thirth Edition. New York Berlin Heindelbeg London Paris Tokio Hong-Kong Barcelona Budapest Springer-Verlag, 1995.

THOMPSON & THOMPSON - **Genética Médica**. 5a. ed. Rio de Janeiro, R.J. Guanabara Koogan, 1991.

TOMMERUP, N. - Mendelian cytogenetics. Chromosome rearrangements associated with mendelian disorders. **J Med Genet** **30**:713-717, 1993.

TALABANI, J.A.L.; SHUBBAR, A.I.; MUSTAFA, K.E. - Major congenital malformations in United Arab Emirates (UAE): need for genetic counselling. **Am Hum Genet** **62**:441-418, 1998.

TOVAR, F.J.P.; ESUQUERDA, G.O.; MERCADO, J.M. - Muerte fetal. **Ginecol Obstet Mex** **56**:189-194, 1988.

URIOSTE, M. - Chromosome cultures from human cartilage. **Am J Med Genet** **46**:123-125, 1993.

VERLOOVE-VANHORICK, S.P.; VERWEY, R.A.; BAND, R.; GRAVENHORST, J.B.; KEIRSE, M.J.N.C.; RUYS, J.H. - Neonatal mortality risk in relation to gestacional age and birthweight. **Lancet** **i**: 55-57, 1986.

YOUNG, I.D.; RICKETT, A.B. & CLARKE, M. - Genetic analysis of malformations causing perinatal mortality. **J Med Genet** **23**:58-63, 1986.

WARBURTON, D.; YU, C.; KLINE, J.; STEIN, Z. - Mosaic autossomal trissomy in cultures from spontaneous abortions. **Am J Hum Genet** **30**:609-617, 1978.

WARBURTON, D.; STEIN, Z.; KLINE, J.; SUSSER, M. - Chromosome abnormalities in spontaneous abortions: Data from the New York City study in human embryonic and fetal death. In: PORTER, I.H.; HOOK, E.B., (eds): **"Human embryonic and fetal death"**. New York: Academic Press, 1980. p 261-287.

WARD, B.E.; GERSEN, S.L.; CARELLI, M.P.; MCGUIRE; DACKOWSKI, W.R.; WEINSTEIN, M.; SANDLIN, C.; WARREN, R.; KLINGER, K.W. - Rapid prenatal diagnosis of chromosomal anuploidies by fluorescence in situ hybridization: clinical experience with 4500 specimens. **Am J Hum Genet** 52:854-865, 1993.

WATT, J.L.; TEMPLETON, A.A.; MESSINI, I.; BELL, L.; CUNNINGHAM, P.; DUNCAN, R.O. - Trisomy 1 in na eight cell human pre-embryo. **J Med Genet** 24:60-64, 1987.

WILCOX, A.J. & SKJOERVEN, R. - Birth weight and perinatal mortality: the effect of gestacional age. **Am J Publ Health** 82:378-382, 1992.

WILSON, R.D.; CHITAYAT, D.; MACGILLIVRAY, B.C. - Fetal ultrasound abnormalities: correlation with fetal karyotype, autopsy findings, and posnatal outcome – five year prospective study. **Am J Med Genet** 44:586-590, 1992.

WINTER, R.M. & SANDIN, B.M. - The radiology of stillbirths and neonatal deaths. **Br J Obstet Gynaecol** 91:762-765, 1984.

ZHANG, J. & CAI, W. - Risk factors associated with antepartum fetal death. **Early Hum Dev** 28:193-200, 1992.

ZHEN, D.K.; WANG, J.Y.; FALCO, V.M.; WEBER, W.; DELLI-BOVI, L.;
BIANCHI, D.W. - Poly-FISH: a technique of repeated hybridizations that
improves cytogenetic analysis of fetal cells in maternal blood. **Prenat
Diagn** 18:1181-1185, 1998.

ZUCOLOTO, S.; BARBIERI, M.A.; GOMES, U.A.; GURGEL, R.Q.;
CIPOLOTTI, R.; KAJIWARA, J.K.; SILVA, L.M.M.F.; RAPOSO,
R.A.M.; TUNA, E.J. - Estudo do comportamento das taxas de
mortalidade fetal perinatal e neonatal em um Hospital Universitário. **J
Ped** 64:299-305, 1988.

ANEXOS

ANEXO 1 – Resultados das Culturas e Análise Cromossômica dos Tecidos Cultivados

Natimortos (nº. Caso)	Idade Gestacional (semanas)	Sexo	Crescimento das Culturas				Malformado	Resultado Cariótipo
			Cartilagem	Pele	Sangue			
					P.C.	C.O.		
2	31	M	NC	NC		+	N	46,XY
5A	40	M	NC	+			N	46,XY
5B	40	M	NC	+			N	46,XY
7mac	25	M	NC	NC		+	N	46,XY
14	38	F	+	+			N	46,XX
19 mac	29	F	NC			+	S	47,XX,+18
20	36	F	+	+			N	46,XX
30	27	M	+	+			N	46,XY
35	26	F			+		S	47,XX,+18
38mac	34	M			NC		N	-
49	32	M			NC		S	-
62	34	M			NC		S	-
75mac	22	F	NC			+	N	46,XX
76	23	M	NC	+			N	46,XY
77	40	F			NC	+	S	46,XX
78	32	M			NC*		S	-
79	25	M	+	+	NC		S	46,XY
85mac	26	M	NC				N	-
86mac	25	F	NC	NC			N	-
92	23	F			+		N	46,XX
95 mac	28	M			NC*		S	-
102 mac	21	F			+		N	46,XX/47,XX,+18
103	40	M			NC	+	S	46,XY
106mac	34	M	NC				S	-
108mac	24	M	NC				N	-
Total								25

P.C.: punção cardíaca**C.O.:** cordocentese**S:** sim**N:** não**+** : crescimento positivo**NC:** crescimento negativo**NC*:** crescimento negativo/contaminação**mac:** macerados

ANEXO 1 – Resultados das Culturas e Análise Cromossômica dos Tecidos Cultivados

Óbitos neonatais (nº. caso)	Idade (dias)	Sexo	Crescimento das culturas				Malformado	Resultado
			Cartilagem	Pele	Sangue			
					P.C.	C.O.		
1	2	M			+		S	46,XY
3	2	M			NC		N	-
4	10	M	NC	+			N	46,XY
6	7	M	+	+			S	46,XY
8	6	F	NC	+			S	46,XX
10	12	F	+	+	NC		S	47,XX,+21
11	22	M			+		S	46,XY
12	2	M	+	+			N	46,XY
16	12	F	+	+			S	46,XX
17	1	F			+		S	46,XX
18	1	M	+	+			N	46,XY
22	1	F	+	+			N	46,XX
23	6	F	NC*	NC*			N	-
24	8	F	+	+			N	46,XX
25	22	M	+	+			N	46,XY
26	4	F	+	+			N	46,XX
27	1	F	+	+			N	46,XX
28	1	F	NC*	NC*		+	S	46,XX
31		M			+		S	46,XY
32	3	M			+		S	46,XY
33	7	F			+		S	47,XX,+18
34	5	F			+		N	46,XX
36	5	F			NC		S	-
37	27'	F			+		S	46,XX
39		M			+		S	46,XY
40	1	F			+		N	46,XX
42	1	M			NC		N	-
43	8	F			NC		S	-
44	2	M			NC		N	-
45	2	M			NC		N	-
46	1	M			+		S	46,XY
47	14'	M			+		S	46,XY
48	3	M			NC		N	-
50	6	M			NC	+	S	46,XY
51	1	M			+		N	46,XY
53	3	M			NC		S	-
54	20'	F			+		S	46,XX
55	1h	M			NC		S	-
56	1	M			NC		N	-
57	15h	F			NC		S	-
58	1	F			NC	+	S	46,XX
59	1	F			+		N	46,XX
60	5	M			NC	+	S	47,XY,+21

61	2	M			NC		S	-
63	6	M			+		S	46,XY
64	16'	M			+		N	46,XY
65	1h	F			+		S	46,XX
66	8	M			+		N	46,XY
68	3	F			+		S	46,XX
69	3	F			+		S	46,XX
71	18	M			+		N	46,XY
72	5h	M			NC		S	-
73	9h	F			+	+	S	46,XX
74	2h	F	NC	NC	+		S	46,XX
81	6h	M	+	+			S	46,XY
82	2	M			+		N	46,XY
83	17	M			+		S	46,XY
84	8	M			+		S	46,XY
88	7h	M			+		S	46,XY
89	7h	F			NC		S	-
90	1	F			+		S	46,XX
91	10	F			NC	+	N	46,XX
93	5'	F			+		N	46,XX
94	6	M			NC*		N	-
96	1	M			NC*		S	-
97	14	F			NC*		N	-
98	3	F			+		N	46,XX
99	1h	M			+		S	46,XY
100	8h	M			+		S	46,XY
101	3h	M			+		N	46,XY
104					NC		N	-
105	1h	F			+		N	46,XX
107	20'	M	+				N	-
109	15h	F			+		S	47,XX,+18/48,XX,+18,+mar
110	30'	M			+		S	47,XY,+18
111	6	F			+		S	46,XX
112	1	M			+		S	46,XY
Total								78

P.C.: punção cardíaca

C.O.: cordocentese

S: sim

N: não

+ : crescimento positivo

NC : crescimento negativo

NC*: crescimento negativo/contaminação

FIGURAS

FIGURA 1: Fotomicrografia de metáfase obtida por cultivo de condrócitos humanos.

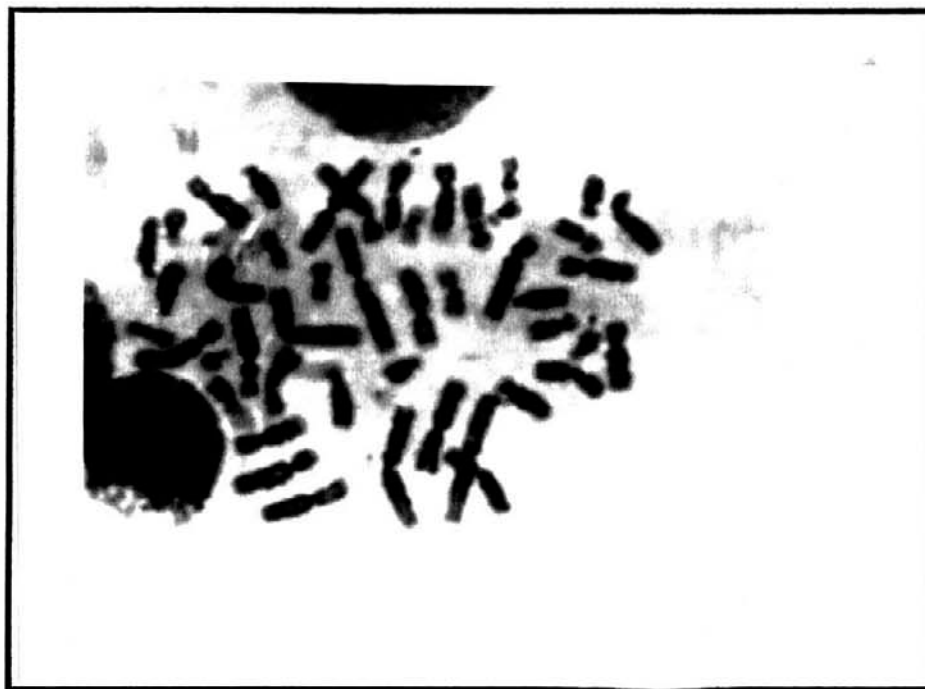


FIGURA 2: Cariótipo montado a partir de uma metáfase obtida por cultivo de condrócitos humanos – paciente de número 6.

