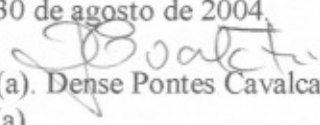


DANIELLE RIBEIRO LUCON

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso
de Pós-Graduação Ciências Médicas da Facul-
dade de Ciências Médicas da UNICAMP, para
obtenção do título de Mestre em Ciências Médi-
cas, área de Ciências Biomédicas do(a) aluno(a)
Danielle Ribeiro Lucon.

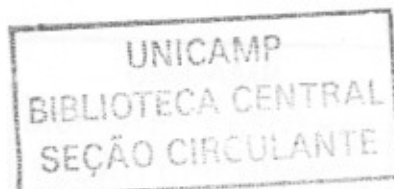
Campinas, 30 de agosto de 2004.

Prof(a). Dr(a).  Denise Pontes Cavalcanti.
Orientador(a)

***“ESTUDO DO CARIÓTIPO CONSTITUCIONAL E DOS
TECIDOS ENVOLVIDOS NA LESÃO DE CRIANÇAS
PORTADORAS DE DEFEITO DO TUBO NEURAL (DTN)
POR MEIO DE ANÁLISE CITOGENÉTICA
CONVENCIONAL E FISH”***

CAMPINAS

2004



DANIELLE RIBEIRO LUCON

**“ESTUDO DO CARIÓTIPO CONSTITUCIONAL E DOS
TECIDOS ENVOLVIDOS NA LESÃO DE CRIANÇAS
PORTADORAS DE DEFEITO DO TUBO NEURAL (DTN)
POR MEIO DE ANÁLISE CITOGENÉTICA
CONVENCIONAL E FISH”**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-graduação
da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências
Biomédicas*

ORIENTADORA: DRA. DENISE PONTES CAVALCANTI

CAMPINAS

2004

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	L964e
V	EX
TOMBO BC	62956
PROC.	16-86-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	31.03.05
Nº CPD	

CAMP

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

L964e
L694e

Lucon, Danielle Ribeiro

"Estudo do cariótipo constitucional e dos tecidos envolvidos na lesão de crianças portadoras de defeito do tubo neural (DTN) por meio de análise citogenética convencional e FISH" / Danielle Ribeiro Lucon. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Denise Pontes Cavalcanti

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mosaicismo. 2. Aneuploidia. 3. Defeito do Tubo Neural. 4. Anormalidades. 5. Tecido nervoso. 6. Sistema nervoso. I. Denise Pontes Cavalcanti. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

SLP

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a).

Denise Pontes Cavalcanti

Membros:

1. Prof. Dra. Denise Pontes Cavalcanti

2. Prof. Dra. Carmem Silva Bertuzzo

3. Prof. Dr. Ferando Regla Vargas

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/08/2004

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), FAEP e CNPq.

DEDICATÓRIA

*Aos meus Pais Sérgio e Ermelinda,
pelo incentivo irrestrito e por
acreditarem na minha luta.*

*Aos meus irmãos Denise e Júnior,
pelo carinho e compreensão.*

*Ao meu namorado Ricardo,
pelo apoio e paciência*

*Para as pessoas que caminharam
comigo, meu Amor e o meu*

Muito Obrigada.

A Deus, pela dádiva de tornar realidade um sonho que se tornou tanto meu quanto de minha família, namorado e amigos que trilharam comigo durante esse período.

Aos meus pais, que sorriram e sofreram comigo nessa etapa da minha vida, a minha eterna gratidão e o meu amor incondicional.

Aos meus irmãos, que me apoiaram e souberam dizer palavras doces e confortantes em todos os momentos, o meu eterno Amor.

Ao meu namorado, que soube me olhar com amor mesmo nos momentos mais difíceis e que me ajudou a trilhar esse caminho me apoiando do começo ao fim, o meu amor e gratidão.

Às Amigas Raquel, Juliana, Vanessa, Cássia, Taís, Tatiana, Daniela, Luciene, e os Amigos Danilo, Alex, Marcello, Bruno e Maurício por compartilhar da minha luta dia a dia e torná-la mais prazerosa. Por me mostrarem que uma lágrima pode ser doce e um sorriso pode ser mágico.

Às Amigas Fernanda e Priscila pelo apoio, carinho e colinho, sem falar das baladas. Com certeza vocês me ajudaram a enfrentar os últimos meses de tese e estarão presentes para sempre.

Às enfermeiras do Centro Cirúrgico e Centro Obstétrico, aos cirurgiões neurovasculares, a estatística Shirley e a todas as pessoas do CAISM que estiveram presentes para que esse trabalho fosse realizado, o meu Muito Obrigado e Todo meu Carinho.

Aos amigos Andrés e Lilian do Hospital Boldrini e Sílvia Toledo da UNIFESP pelo apoio e carinho, e por me ajudarem a capturar as imagens dos cariótipos.

À minha orientadora, Denise, pela amizade e orientação de um belo trabalho que com certeza, surgirão novas hipóteses.

A todos, que estiveram presentes nessa luta, deixo aqui um pouco de mim e levo muito de vocês comigo. Meu Amor e Muito Obrigada!

*“O Guerreiro da Luz olha a vida
com doçura e firmeza.
Sabe que está diante de um mistério,
cuja reposta encontrará um dia – mas ainda
é cedo para respostas.
Então procura comportar-se de acordo
com as suas convicções e sua fé”.
Volta e meia, o guerreiro pára e diz:
“mas essa vida é uma loucura”. Ele tem razão.
Entregue ao milagre do cotidiano,
ele percebe que nem sempre é capaz de
prever as conseqüências de seus atos.
Muitas vezes age sem saber que está agindo,
salva sem saber que está salvando,
sofre sem saber por que está triste.
Sim, é uma loucura.
Mas a grande sabedoria do Guerreiro da Luz
consiste em escolher bem
a sua loucura”.*

Paulo Coelho

	PÁG.
RESUMO	xxxi
ABSTRACT	xxxv
1- INTRODUÇÃO	39
2- REVISÃO DA LITERATURA	43
2.1- Definições.....	45
2.1.1- Anencefalia.....	45
2.1.2- Espinha bífida.....	45
2.1.3- Encefalocele.....	47
2.2- Embriologia.....	49
2.2.1- Teoria dos múltiplos sítios.....	53
2.3- Epidemiologia.....	55
2.4- Etiologia.....	57
2.4.1- Fatores ambientais associados a DTN.....	57
2.4.2- Fatores genéticos associados aos DTN.....	59
2.4.2.1- Genética molecular.....	59
2.4.2.2- Citogenética.....	60
3- OBJETIVOS	65
4- MATERIAIS E MÉTODOS	69
4.1- Desenho.....	71
4.2- Tamanho amostral.....	71

4.3- Seleção de sujeitos e Coleta de dados.....	71
4.4- Variáveis e conceitos.....	72
4.5- Testes, técnicas e exames.....	73
4.5.1- Avaliação clínica.....	73
4.5.2- Avaliação laboratorial.....	74
A. Citogenética convencional.....	74
B. Técnica de citogenética do núcleo interfásico.....	76
4.6- Processamento e análise de dados.....	78
5- RESULTADOS.....	79
5.1- Características clínicas.....	82
5.2- Controle.....	83
5.3- Amostra.....	83
6- DISCUSSÃO.....	103
Considerações finais.....	114
7- CONCLUSÃO.....	115
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
9- ANEXOS.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS

DTN	Defeito do Tubo Neural
DPN	Diagnóstico pré-natal
RN	Recém-nascido
CV	Cérebro-vascular
EB	Espinha Bífida
EBL	Espinha Bífida Lombar
EBLS	Espinha Bífida Lombar Sacral
EBS	Espinha Bífida Sacral
EBC	Espinha Bífida Cervical
EBCL	Espinha Bífida Cervical Lombar
FISH	“Fluorescence in situ hybridization” (Hibridização “in situ” com fluoresceína)
GTG	Bandamento cromossômico por ação da tripsina e coloração das bandas com Giemsa
CBG	Bandamento cromossômico por ação do bário e coloração das bandas com Giemsa
ICSN	“International System for Human Cytogenetic Nomenclature” (Sistema Internacional para nomenclatura em Citogenética Humana)
IC	Intervalo de Confiança
PBS	Tampão fosfato
SFB	Soro Fetal Bovino
SSC	Solução Salina de Citrato

	PÁG.
Tabela 1- Distribuição do total de amostra (41 casos) de acordo com o tipo de defeito.....	81
Tabela 2- Distribuição dos tipos de lesões em relação ao sexo.....	82
Tabela 3- Media e Intervalo de confiança das marcações diplóides para cada cromossomo estudado a partir das suas respectivas sondas alfa-centroméricas.....	84
Tabela 4- Média, Desvio Padrão e $x + 2DP$ das marcações monossômicas e trissômicas para cada cromossomo estudado.....	86
Tabela 5- Relação dos 13 casos estudados de acordo com o cariótipo constitucional (sangue ou pele) e cariótipo do tecido cérebro-vascular. Todos os casos estão referidos de acordo com o tipo de defeito e o resultado da análise de FISH interfásico.....	90
Tabela 6- Resultado da análise do FISH interfásico do tecido cérebro-vascular dos 18 casos estudados de acordo com o número de sinais encontrados em cada cromossomo.....	91
Tabela 7- Relação dos casos estudados segundo o tipo de defeito e o cariótipo do tecido cérebro-vascular.....	98
Tabela 8- Resultado da análise do FISH interfásico do tecido cérebro-ascular dos casos que não apresentaram análise por citogenética convencional de acordo com o número de sinais encontrados em cada cromossomo.....	98
Tabela 9- Relação dos casos estudados que tiveram cariótipo de linfócitos estudados, de acordo com o tipo de defeito.....	100

Tabela 10-	Resultado da análise do FISH interfásico de linfócitos dos casos 19 e 41 que apresentaram cariótipo alterado por citogenética convencional de acordo com o número de marcações encontradas...	101
Tabela 11-	Resultado da análise do FISH interfásico do tecido cérebro-ascular do caso 30 de acordo com o número de sinais encontrados em cada cromossomo.....	101

	PÁG.
Figura 1- Anencefalia.....	48
Figura 2- Espinha bífida.....	48
Figura 3- Encefalocele.....	48
Figura 4- Desenvolvimento de células nervosas do córtex cerebral.....	52
Figura 5- Esquema dos sítios de fechamento.....	54
Figura 6- Células aderentes, provenientes de tecido cérebro-vascular, após 8 dias de cultivo.....	87
Figura 7- Caso 3: estudo do tecido cv. A) Cariótipo convencional normal do tecido cv; B) Núcleos interfásicos marcados com a sonda D6Z2 mostrando um sinal do cromossomo 6.....	93
Figura 8- Caso 9: Estudo do tecido cv. A) Cariótipo 46,XX; B) Cariótipo 92,XXXX; e C) Núcleos interfásico marcados apresentando 2 sinais e 4 sinais, confirmando o cariótipo 2N/4N.....	94
Figura 9- Caso 10: Estudo do tecido cv. Núcleos interfásico marcados com sonda alfa-centroméricas do cromossomo 13/21 (D13Z1/D21Z1). A) Núcleos normais apresentando 4 sinais; B) Núcleos apresentando 4, 5 e 10 sinais.....	95
Figura 10- Estudo da biópsia de pele. A) Cariótipo 46,XY; B) Cariótipo 92,XXYY; e C) Metáfase e núcleos interfásico D) marcados com sonda alfa-centroméricas do cromossomo E) Y (DYZ1), apresentando 1 sinal e 2 sinais, confirmando F) o cariótipo 2N/4N...	96

Figura 11-	Caso 4: estudo do tecido cv. A) Cariótipo apresentando monossomia do cromossomo 8; B) Núcleos interfásicos marcados com a sonda D8Z1 mostrando dois sinais do cromossomo 8, não confirmando a monossomia.....	97
Figura 12-	Caso30: A) Cariótipo do propósito: 46,XY,inv(9qh); B) Cariótipo do pai do propósito: 46,XY,inv(9qh); C) Cariótipo do propósito com bandamento CBG, indicando o cromossomo 9.....	102

	PÁG.
Anexo 1- Termo de consentimento dos responsáveis para a coleta de tecidos e sangue.....	139
Anexo 2- Termo de consentimento dos responsáveis para a coleta de sangue dos controles.....	141
Anexo 3- Protocolo de aprovação deste projeto de Pesquisa pela Comissão de Ética em Pesquisa – FCM/UNICAMP.....	143
Anexo 4- Protocolo de aprovação deste projeto de pesquisa principal pela Comissão de Ética em Pesquisa – FCM/UNICAMP.....	145
Anexo 5- Distribuição dos 41 casos de DFTN de acordo com as características clínicas dos 41 casos estudados.....	147
Anexo 6- Resultado da análise do FISH interfásico das 10 amostras controles estudados de acordo com o número de sinais encontrados em cada cromossomo.....	151
Anexo 7- Resumo clínico dos casos com alteração citogenética mostrados na Tabela 5.....	153
Anexo 8- Resumo clínico dos casos com alteração citogenética mostrados na Tabela 9.....	155

RESUMO

A associação entre anomalias cromossômicas, especialmente de aneuploidias e defeito do tubo neural (DTN) é bem conhecida, principalmente se o DTN é associado com outra malformação. Recentemente, estudos em modelos animais, utilizando a técnica de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), identificaram aneuploidias em tecido nervoso. Com o objetivo de verificar a frequência e a possível ocorrência de anormalidade cromossômica restrita ao tecido cérebro-vascular (CV) em fetos e recém-nascidos com DTN, foram utilizadas técnicas de citogenética convencional em linfócitos e tecido CV, e análise desse por FISH-Multiprobe. A análise pelo FISH foi realizada em 10 recém-nascidos normais a fim de estabelecer o intervalo de confiança (IC) dos sinais diplóides. Foram avaliados 41 casos de DTN, que foram divididos em 3 grupos, de acordo com a amostra coletada e estudo citogenético: 1) grupo com cariótipo de linfócitos e de tecido CV, 13 casos; 2) grupo com cariótipo de tecido cérebro-vascular, 5 casos; e 3) grupo de pacientes com cariótipo de linfócitos, 23 casos. No grupo 1, três pacientes apresentaram cariótipo anormal restrito ao tecido CV: mos 92,XXYY/46,XY, mos 92,XXXX/46,XX, monossomia do cromossomo 6 em mosaico, representando dois casos de espinha bífida e um caso de anencefalia, respectivamente. A frequência de anomalias cromossômicas nesse estudo foi de 6%. Foi possível observar uma maior porcentagem de aneuploidias restritas ao tecido CV. A porcentagem de aneuploidias encontradas neste tecido foi de 15% quando estudados por citogenética convencional e de 25% quando analisados por FISH. No grupo 2, todos os casos apresentaram cariótipo normal. No grupo 3, dois casos de anencefalia apresentaram cariótipo anormal: chi 47,XY,+21/46,XX e mos 92,XXYY/46,XY e dois casos apresentaram heteromorfismos 46,XY,inv(9qh) (espinha bífida) e 46,XX,21ps+ (encefalocele). Concluindo, há uma maior porcentagem de alteração cromossômica restrita ao tecido cérebro-vascular. Essa porcentagem foi semelhante à porcentagem encontrada em tecidos nervosos de roedores. Estes resultados sugerem que anomalias numéricas podem ser muito comuns em tecidos envolvidos no defeito do tubo neural. Entretanto, estes resultados sugerem que estudos futuros com tecido neural em humanos sejam fundamentais para esclarecer a relação entre anomalia cromossômica e tecido nervoso.

ABSTRACT

The association between chromosomal abnormalities, specially aneuploidies and neural tube defects (NTDs) is well known, principally when NTD is not the only malformation present. Recently, research in animal models, using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) identified aneuploidy in neural tissues. The aims of this work were to identify the frequency of chromosomal abnormalities in NTDs fetuses and newborns and the possible association of them restricted to cérebro-vascular (CV) tissue. For the detection of aneuploidy conventional cytogenetic studies on lymphocytes and CV tissue and interphase FISH of CV tissue utilizing alfa-centromeric probes of 18 chromosomes (FISH-Multiprobe/Cytocell) were performed. In order to establish the confidence interval of the diploid signals the interphase FISH analysis was performed in 10 control individuals, showing mean near to 100%. Forty one NTDs cases were evaluated and separated into three groups, according to the collected samples and their analysis. Group 1: karyotype from lymphocytes and CV tissue and FISH analysis from both, 13 cases. Group 2: karyotype from CV tissue, 5 cases. Group 3: karyotype from lymphocytes, 23 cases. In group 1, 4 (31,0%) presented abnormal karyotypes restricted to CV tissue: mos 92,XXYY/46,XY, mos 92,XXXX/46,XY on spina bifida and monossomy of the chromosome 6 in mosaic on anencephaly. The frequency of chromosomic anomalies in that study was of 6%. A larger percentage of restricted aneuploidies on CV tissue was observed. The aneuploidies percentage found in this tissue was of 15% when studied by conventional cytogenetics and of 25% when analyzed by FISH. In group 2, all samples presented normal karyotypes. In group 3, two cases of anencephaly presented abnormal karyotype: chi 47,XY,+21/46,XX and mos 92,XXYY/46,XY and two cases presented heteromorphisms 46,XY,inv9(qh) (spina bifida) and 46,XX,21ps+ (encephalocele). There is a greater proportion of aneuploidy restricted to CV tissue. The percentage observed in that tissue was 25%, similar to neural tissues of rodents in experimental studies (33%). These results suggest that numeric anomalies can be very common in tissue involved with NTD. However, these results suggest that further studies with neural tissue in humans are fundamental to explain the relationship between chromosomic anomaly and nervous tissue.

1- INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central (SNC) se desenvolve a partir da placa neural observada no embrião de três semanas, cujos bordos formam as pregas neurais, as quais se aproximam na linha média provocando o fechamento e conseqüente formação do tubo neural. Este dará origem a todo o SNC (LARSEN, 1998).

Os Defeitos do Tubo Neural (DTN), são malformações do SNC, causadas por uma falha no processo de fechamento do tubo neural por volta da 3^o semana. Os DTNs incluem anencefalia, espinha bífida e encefalocele, com prevalência em recém-nascidos de 1 a 3 por 1000 (LAURENCE, 1993).

Os DTN podem se apresentar de forma isolada ou associada a outros defeitos, inclusive fazendo parte do quadro clínico de síndromes bem conhecidas como, por exemplo, trissomia do cromossomo 18 ou síndromes gênicas como a síndrome de Meckel Gruber (HALL *et al.*, 1988; BYRNE *et al.*, 1986; AL-GASALI *et al.*, 2001). Anomalias cromossômicas tem sido relacionadas aos DTNs, principalmente quando associados a outras malformações (SINGER *et al.*, 1987; NEWTON *et al.*, 1994). Porém, a maioria dos DTN aparece de forma isolada sendo, geralmente, reconhecidos como anomalias de etiologia multifatorial (HALL *et al.*, 1988), para a qual se conhece hoje pelo menos uma alteração molecular associada – a mutação C677T no gene da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) e vários fatores de risco ambiental, como a deficiência de ácido fólico e o uso de alguns medicamentos (BOTTO *et al.*, 1999; RAJESH *et al.*, 2001).

HAUPT *et al.* (1995), estudaram 18 indivíduos afetados por defeitos do tubo neural e analisaram os cromossomos dos tecidos envolvidos na lesão e não encontraram nenhuma alteração cromossômica. Recentemente, estudos em modelos animais, utilizando a técnica de FISH, identificaram aneuploidias em tecido nervoso (REHEN *et al.*, 2001).

Embora relativamente raros na população geral, a alta prevalência dos DTN na Maternidade do CAISM propicia a investigação desses defeitos cujos mecanismos etiopatogênicos ainda são bastante obscuros. O estudo citogenético desses defeitos, seja avaliando o cariótipo constitucional dos afetados, seja analisando os tecidos envolvidos na lesão pode contribuir para um maior conhecimento sobre os fatores biológicos associados a esse grupo de defeitos.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – DEFINIÇÕES

O termo “DTN”, como o nome sugere, é usado para designar todas as malformações do sistema nervoso central causadas pela falha de fechamento do tubo neural em etapas precoces da embriogênese. Os DTN compreendem, classicamente, a anencefalia, a espinha bífida e encefalocele. (LAURENCE, 1992; NORTHRUP e VOLCIK, 2000; SADLER, 2000).

2.1.1 – Anencefalia

A anencefalia é a forma mais grave e letal, caracterizada por ausência completa ou parcial da calota craniana com exposição e degeneração do tecido nervoso (LAURENCE, 1993) (Figura 1). Ao nascimento o feto pode apresentar uma massa cérebro-vascular que consiste de tecido vascular e esponjoso, colágeno, vasos sanguíneos, cistos, glias, plexos coróides irregulares e hemorragias e todos recobertos por um saco epitelial. O feto apresenta sem testa, orelhas de implantação baixa, nariz longo e aquilino, boca pequena, pescoço curto, globos oculares protuberantes, pavilhões auriculares malformados, base do crânio diminuída, e fossa posterior com diâmetro transversal aumentado. A sobrevivência é em média algumas horas (DIAMANTE e CYPEL, 1996).

Quando o defeito craniano se estende do osso frontal ao osso occipital (forma mais comum de anencefalia), recebe o nome de merocrânio. O holocrânio é caracterizado por um defeito mais extenso da caixa craniana. Quando esses defeitos são acompanhados por defeitos de fechamento na região medular recebem o nome de craniorraquisquise. Quando o defeito do crânio é observado também em parte da face recebe a denominação de faciocraniorraquisquise. Denomina-se faciocraniorraquisquise quando esse último defeito é acompanhado de falha do fechamento na região da medula (VAN ALLEN et al., 1993).

2.1.2 – Espinha Bífida

A espinha bífida (EB) é o tipo mais freqüente de DTN entre os recém-nascidos vivos. Consiste em um defeito ósseo na linha média das vértebras. O defeito pode ser exclusivo do arco da vértebra (EB oculta), ou pode ocorrer exposição do conteúdo do canal

vertebral (EB aberta ou EB cística) (LAURENCE, 1992; NORTHROP et al., 2000) (Figura 2).

➤ *Espinha bífida oculta*

Este defeito do arco vertebral surge quando as metades embrionárias do arco não crescem normalmente e não se fundem no plano mediano. A espinha bífida oculta ocorre mais freqüentemente nas vértebras L5 ou S1. Em sua menor forma, a única evidência de sua presença pode ser uma pequena depressão com um tufo de pelos. Uma pequena percentagem das crianças afetadas tem defeitos funcionalmente significativos da medula espinhal subjacente e das raízes espinhais.

➤ *Espinha bífida cística*

É dividida em 3 formas:

- ***Espinha Bífida com meningocele***: quando o saco herniário contém as meninges e o fluido cerebroespinal. A medula espinhal e as raízes espinhais estão em sua posição normal, mas pode haver anormalidade dessas estruturas. A meningocele pode ocorrer em diversos níveis do canal medular, sendo as lombossacrais as mais freqüentes.
- ***Espinha Bífida com mielomeningocele***: quando a medula espinhal e/ou raízes nervosas estão incluídas no saco herniário. As mielomeningoceles podem estar cobertas por pele ou por uma membrana delgada que se rompe com facilidade. É mais comum e mais grave que a anterior. A mielomeningocele também pode ocorrer em diversos níveis a coluna, sendo que a incidência é de 25% para as regiões torácica e tóraco-lombar, 40% para a região lombar, 25% para a região lombossacral e 10% para a região sacral. As de localização cervical são muito raras. O centro do saco herniário tem aspecto róseo e é constituído por tecido nervoso medular ou raízes nervosas disgenéticas e área de intensa gliose, a área neurovascular de Von Recklinghausen. Essa área é revestida por restos de meninges alteradas que se unem periféricamente à pele normal ou com angiomas.

Nas meningomieloceles lombossacrais, é comum paralisia dos esfíncteres (vesical e/ou anal). A hidrocefalia se desenvolve na maioria dos casos de mielomeningocele sendo a maioria ocasionada pela malformação do espaço subaracnóideo associada à malformação de Arnold-Chiari.

- ***Espinha bífida com miosquise***: é o tipo mais grave de espinha bífida. Neste caso, a medula espinhal na área afetada está aberta, porque as pregas neurais também não se fundiram. Isto faz com que a medula espinhal seja representada por uma massa achatada de tecido nervoso (SADLER, 2000).

A espinha bífida cística apresenta graus variáveis de déficit neurológico, dependendo da posição e da extensão da lesão. Usualmente, há perda da sensibilidade do dermatomo correspondente, juntamente com paralisia completa ou parcial dos músculos esqueléticos.

2.1.3 – Encefalocele

A cefalocele e encefalocele são os DTN menos frequentes. Possuem alta taxa de mortalidade e definem a protusão de conteúdo craniano, através de um defeito ósseo no crânio (LAURENCE, 1993). A cefalocele consiste de um saco meníngeo, cheio de líquido e recoberto por pele ou uma fina membrana. Quando há presença de tecido cerebral desse saco herniário, denomina-se encefalocele. As encefaloceles classificam-se em sincipital (quando extranasal perto da glabella, testa ou órbita), basal (quando intranasal e na região da nasofaringe) e occipital (quando na região suboccipital) (Figura 3). Podem apresentar-se ao nascimento, com a possibilidade de associação com meningite (nasal glioma).



Figura 1- Anencefalia – Vista dorsal



Figura 2- Espinha bífida cística lombar



Figura 3- Encefalocele occipital

2.2 – EMBRIOLOGIA

Segundo FITZGERALD (1980), logo após a fertilização, inicia-se o processo de divisão celular repetida e a formação de células chamadas blastômeros. Por volta do quarto dia após a fecundação, forma-se a mórula, um maciço celular que contém de doze a dezesseis blastômeros. Logo se forma uma cavidade na mórula, convertendo-a em um blastocisto que consiste em (1) uma massa celular interna, ou embrioblasto, que vai originar o embrião, (2) uma cavidade blastocística e (3) uma camada externa de células, o trofoblasto, que envolve a massa celular interna e a cavidade blastocística, e forma depois a parte embrionária da placenta.

De quatro a cinco dias após a fertilização, a zona pelúcida desaparece, e o blastocisto prende-se ao epitélio endometrial. As células do sinciciotrofoblasto invadem, então, o epitélio endometrial e o seu estroma subjacente. Simultaneamente, o hipoblasto começa a formar-se na superfície profunda da massa celular interna. Ao final da primeira semana, o blastocisto está superficialmente implantado no endométrio.

Na segunda semana do desenvolvimento embrionário, aparece a cavidade amniótica como um espaço entre o citotrofoblasto e a massa celular interna. O embrioblasto diferencia-se num disco embrionário bilaminar, consistindo no epiblasto, relacionado com a cavidade amniótica, e no hipoblasto, adjacente à cavidade blastocística.

Durante a terceira semana de desenvolvimento do embrião, inicia-se o processo de formação de camadas germinativas - endoderme, mesoderme e ectoderme - que é denominado gastrulação. A gastrulação inicia-se com a formação da linha primitiva, um espessamento na linha média do epiblasto na extremidade caudal do disco embrionário. Ela dá origem a células mesenquimais que migram ventralmente, lateralmente e cranialmente entre o epiblasto e o hipoblasto.

Na sua extremidade rostral, a linha primitiva apresenta um espessamento chamado de nó primitivo, que por sua vez apresenta uma depressão central conhecida como fosseta primitiva. Tão logo a linha primitiva começa a produzir células mesenquimais, a camada epiblastica passa a chamar-se ectoderma embrionário, e o hipoblasto, endoderma

embrionário. As células mesenquimais produzidas pela linha primitiva logo se organizam numa terceira camada germinativa, o mesoderma intra-embrionário. O nó primitivo produz células mesenquimais que formam o processo notocordal. Este se estende em direção encefálica, a partir do nó primitivo, como um bastão de células entre o ectoderma e o endoderma. Quando totalmente formado, o processo notocordal vai do nó primitivo à placa pré-cordal. Surgem aberturas no assoalho do canal notocordal que logo coalescem, deixando uma placa notocordal. A placa notocordal dobra-se para formar a notocorda. A notocorda forma o eixo primitivo do embrião em torno do qual se constituirá o esqueleto axial.

A placa neural aparece como um espessamento na linha média do ectoderma embrionário, em posição cefálica ao nó primitivo. A placa neural é induzida a formar-se pelo desenvolvimento da notocorda e do mesênquima que lhe é adjacente. Um sulco neural, longitudinal forma-se na placa neural; o sulco neural é flanqueado pelas pregas neurais, que se juntam e se fundem para originarem o tubo neural, que dará origem ao SNC. O desenvolvimento da placa neural e o seu dobramento para formar o tubo neural são chamados neurulação. Com a fusão das pregas neurais para formar o tubo neural, células neuroectodérmicas migram ventrolateralmente para constituírem a crista neural, entre o ectoderma superficial e o tubo neural. A crista neural logo se divide em duas massas que dão origem aos gânglios sensitivos dos nervos cranianos e espinhais. As células da crista neural dão origem a várias outras estruturas.

O mesoderma de cada lado da notocorda se espessa para formar as colunas longitudinais do mesoderma paraxial. A divisão dessas colunas mesodérmicas paraxiais em pares de somitos começa na região cefálica, no final da terceira semana. Os somitos são agregados compactos de células mesenquimais, de onde migram células que darão origem às vértebras, costelas e musculatura axial.

No momento em que a neurulação é completada, o SNC é representado por uma estrutura tubular fechada com uma porção caudal estreita, a medula espinhal, e uma porção cefálica bem mais larga caracterizada por dilatações encefálicas primárias, denominadas, no sentido crânio-caudal, prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, respectivamente.

Medula Espinhal

À medida que as dobras neurais se juntam, as células neuroectodérmicas formam um epitélio pseudo-estratificado que se estende desde superfícies internas até superfícies externas (membranas limitantes) do tubo neural. Os núcleos celulares inicialmente dispersam-se homogeneamente, mas rapidamente migram na direção do canal central. Na porção interna, conhecida como *zona ventricular*, as células dividem-se, destacando-se progressivamente das membranas limitantes. Contudo, algumas mantêm suas aderências para proporcionar um caminho para a saída das células filhas. As células filhas são de dois tipos, nervosas e neurogliais. Ambas completam a sua diferenciação na *zona intermediária* ou *zona do manto* do tubo neural.

Córtex cerebral

A divisão nuclear ocorre na zona ventricular. Um núcleo-filho permanece na zona ventricular, enquanto o segundo move-se para fora, dentro da fita de citoplasma. Apenas quando alcança a zona marginal, ele separa-se da célula-mãe, sendo o núcleo expulso numa gotícula de citoplasma. Este neuroblasto recém-formado dá origem aos dendritos apical e basal e a um axônio, adotando o aspecto piramidal típico dos neurônios corticais, enquanto afasta-se da superfície pial ao longo de uma plataforma de células neurogliais (Figura 4).

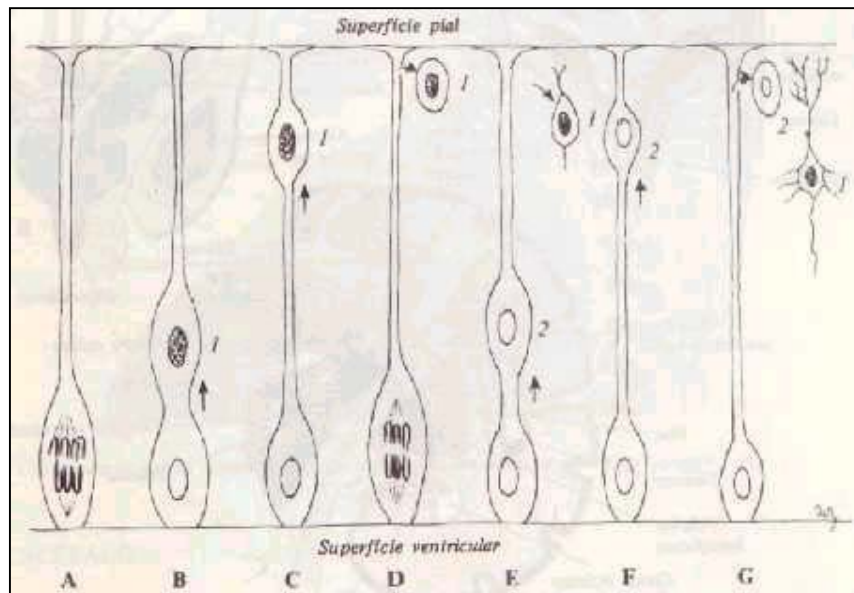


Figura 4- Esquema mostrando o desenvolvimento de células nervosas no córtex cerebral: **A**, mitose na zona ventricular; **B**, migração do núcleo da célula 1; **C**, núcleo da célula 1 alcançando a superfície pial; **D**, expulsão da célula 1, mitose na zona ventricular; **E**, diferenciação da célula 1, migração do núcleo 2; **F**, repetição de C; **G**, expulsão da célula 2 superficialmente à célula 1 (copiado de FITZGERALD,1980).

2.2.1 – Teoria dos múltiplos sítios de fechamento do tubo neural e DTN

A teoria mais aceita até hoje postula que o fechamento do tubo neural se inicia num único ponto, correspondente à futura região cervical e após isso ocorra um fechamento semelhante ao de um zíper no sentido cranial e caudal (LARSEN, 1998), SADLER (2000) já havia sugerido a existência de mais um sítio de fechamento, assim como outras teorias têm sido aventadas em modelos animais e humanos (GOLDEN e SCHÖNE, 1993; JURILOFF et al., 1991; DESESSO et al., 1999; NAKATSU et al., 2000).

Segundo Van ALLEN et al. (1993), há fortes evidências que o tubo neural se feche a partir de cinco pontos iniciais e a conclusão do fechamento dar-se-ia também de modo semelhante ao de um zíper. O primeiro sítio de fechamento se iniciaria na região cervical e progrediria nas direções cranial e caudal, formando caudalmente o neurotubo torácico e prossegue rostralmente até abaixo das fossetas ópticas. O segundo sítio de fechamento teria início na junção entre o prosencéfalo e o mesencéfalo e também seguiria em ambas direções, caudal e cranial. O terceiro sítio de fechamento se inicia na parte mais rostral do término das pregas neurais, adjacente ao estomodeu, prosseguindo caudalmente até encontrar o segundo sítio de fechamento, formando o verdadeiro neuróporo anterior. O quarto sítio de fechamento começa na extremidade caudal do rombencéfalo e é unidirecional, prosseguindo rostralmente em direção ao sítio dois. O fechamento do quinto sítio, descrito somente em humanos, tem início na extremidade caudal do tubo neural prosseguindo da região da segunda vértebra sacral à região da segunda vértebra lombar unidirecionalmente (Figura 5).

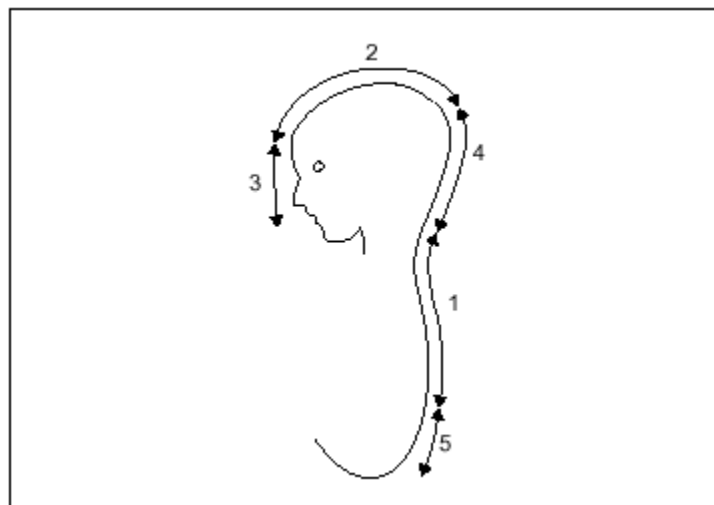


Figura 5- Esquema dos sítios de fechamento de acordo com VAN ALLEN et al. (1993).

Uma falha do fechamento em qualquer um desses sítios do tubo neural pode levar, dependendo da sua localização anatômica, a um dos seguintes três tipos de defeito do tubo neural (DTN): anencefalia, espinha bífida ou encefalocele. (MARTINEZ-FRIAS et al., 1996; VAN ALLEN et al., 1996; CALVO et al., 2002).

A anencefalia resulta da falha no fechamento do sítio 2 dando origem ao merocrânio, e a falha do fechamento nos sítios 2 e 4 levaria ao holocrânio. A cranioraquisquise é resultado da falha no fechamento dos sítios 2, 4 e 1 e a falha do fechamento do sítio 3 corresponderia à faciocranioraquisquise (VAN ALLEN et al., 1993; URIOSTE e ROSA, 1998). As espinhas bífidas seriam originadas de falhas em diversos pontos do sítio 1 ou falhas no fechamento do sítio 5. As cefalocelos frontal e parietal seriam originadas de falha na junção dos sítios de fechamento 3 e 2 ou 2 e 4 (a prosencefalia e mesencefalia). A cefalocele occipital resultada da fusão incompleta do sítio 4. Em humanos, o tubo neural caudal pode ter um 5º sítio envolvendo L2 a S2 (VAN ALLEN et al., 1993).

Exposição ambiental a teratógenos frequentemente afeta sítios específicos de fechamento, como deficiência de folato (sítios 2, 4, e 1 caudal), administração de ácido valpróico (sítio 5) (VAN ALLEN *et al.*, 1993; CALVO *et al.*, 2002) (sítios 1+5) (CALVO *et al.*, 2002) (e sítio 2) (CRAIG *et al.*, 2000). A diabetes *mellitus* materna parece ter uma clara preferência para produzir defeitos do sítio 4 (CALVO *et al.*, 2002), tal preferência por esse sítio também é notada pelas síndromes genéticas como Meckel-Gruber e Síndrome Walker-Warburg (VAN ALLEN *et al.*, 1993; CALVO *et al.*, 2002). Sendo assim, as falhas de fechamento em sítios diferentes poderiam estar associadas a fatores etiológicos distintos.

2.3 – EPIDEMIOLOGIA

A prevalência, geralmente aceita, dos DFTN é de cerca de 1:1.000 nascidos vivos (ICBDMS, 1991; O' REILLY *et al.*, 2000; RAJESH *et al.*, 2001). Tal prevalência, contudo, apresenta variações geográficas importantes com altas taxas em algumas regiões do planeta como Grã-Bretanha, Irlanda do Norte, México, Chile e Norte da China (NEVIN, 1981; XIAO *et al.*, 1990; ICBDM, 1991; CORTÉS *et al.*, 2001; PEI *et al.*, 2003) e alta prevalência global no sexo feminino (CORTÉS *et al.*, 2001). Os DFTN apresentam baixa prevalência particularmente entre negros (KHOURY *et al.*, 1982; MYRIANTHOPOULOS e MELNICK, 1987) e em países como Itália, França, Noruega, Japão, Estados Unidos, Canadá, África e Mongólia (KHOURY *et al.*, 1982; LEMIRE, 1987).

No Brasil, DTN é uma das mais comuns malformações congênitas com a prevalência de 1:1.000 de recém-nascidos (CASTILLA e ORIOLI, 1985; BRUNONI, 1986).

O Programa de Genética Perinatal (PROGEPE) vem se dedicando ao estudo dos defeitos congênitos no CAISM, e constam nos seus arquivos informações detalhadas sobre todos os RNs malformados desde setembro de 1987. Numa mesa redonda apresentada na reunião da Sociedade Brasileira de Genética em 2000 foi apresentada uma

revisão sobre a epidemiologia dos DTN incluindo uma avaliação sobre os casos de DTN ocorridos no CAISM desde 1987, e cujo quadro resumido pode ser visto abaixo.

Avaliação epidemiológica dos DTN cujos RNs nasceram no CAISM-Unicamp no período set/87 a dez/99 (CAVALCANTI, 2000)

Total de casos : 182

-> tipos morfológicos : anencefalia (43%),

espinha bífida (45%), encefalocele (12%)

-> tipos clínicos : isolado (64%), associado (29%),

sindrômico (5%), brida amniótica (2%)

-> incidência com tendência em aumento :

87-94	2,8 por 1.000
-------	---------------

95-97	5,3 por 1.000 (92% com DPN*)
-------	------------------------------

98-99	8,2 por 1.000
-------	---------------

-> predomínio do sexo feminino (anencefalia)

-> 21% natimortos (41% dos anencéfalos)

-> maioria primigesta (exceto encefalocele)

-> idade materna : curva tende a “J”,** (EB)

-> recorrência familiar : 3,2%

-> consangüinidade : 4%

* DPN= Diagnóstico pré-natal

** Curva tende a “J” significa que a idade materna mais avançada apresenta uma maior probabilidade de gerar crianças com EB.

É interessante observar nesse quadro que a prevalência dos DTN tem mostrado uma tendência a aumento, graças ao efeito do diagnóstico pré-natal. Tal tendência continua em ascensão, uma vez que em 1999 o número absoluto de casos de DTN foi de 16, enquanto que em 2001 nasceram, no CAISM, 29 crianças portadoras de DTN.

Os DTN também foram relacionados com variações sazonais, idade e paridade maternas e nível sócio-econômico (HUNTER, 1993; FREY e HAUSER, 2003).

2.4 – ETIOLOGIA

Os DTN isolados e não sindrômicos possuem, em geral, origem multifatorial e podem ser influenciados por fatores genéticos e ambientais como dieta, anormalidades fisiológicas, como principalmente hipertemia e hiperglicemia (LAMMER et al., 1987; GRAHAM et al., 1998), obesidade (WALLER et al., 1994; SHAW et al., 1996), diabetes materna (BECERRA et al., 1990; CALVO et al., 2002) exposição a teratógenos (LAMMER et al., 1987; RAJESH et al., 2001; CALVO et al., 2002; FINNELL et al., 2003; FREY et al., 2003) e variações étnicas (WENSTROM et al., 2000).

2.4.1 – Fatores ambientais associados a DTN

Status sócio-econômico

A maior parte dos estudos mostra que os DTN são mais frequentes nas classes sócio-econômicas mais baixas (WASSERMAN et al., 1998). Esse padrão foi observado em várias regiões do mundo, inclusive em áreas com altas taxas de ocorrência de DTN, como o México (RAMIREZ-ESPÍTIA et al., 2003) e Carolina do Sul (STEVENSON et al., 2000). O nível sócio-econômico baixo, foi então associado à carência alimentar.

Ácido Fólico

A relação entre deficiência alimentar e DTN vem sendo sugerida há algumas décadas, tomando-se como base a incidência mais elevada desses quadros em populações de condição socio-econômica mais baixa. Embora, HIBBARD e SMITHELLS (1965) já tivessem alertado para uma possível relação entre a deficiência do ácido fólico e a

ocorrência DTN em humanos, essa hipótese só foi confirmada na década seguinte (SMITHELLS et al., 1976).

SIRIKULCHAYANONTA et al. (2004), observaram nas mulheres da Tailândia uma significativa correlação entre a baixa dieta de folato consumido com o baixo nível sérico de folato, apresentando um alto risco dessas mulheres a gerar bebês com DTN. Outros estudos relataram aumento do nível de homocisteína no plasma em mães de crianças com DTN (MILLS et al., 1995; VAN DER PUT et al., 1995; OU et al., 1996; AL-GAZALI et al., 2001).

De fato, vários estudos demonstraram que a administração de ácido fólico periconcepcional, sozinho ou em suplementos multivitamínicos, é efetivo para uma prevenção primária de DTN e tem sido recomendado a mulheres antes e durante os primeiro trimestre de gestação para reduzir tanto a ocorrência como a recorrência de tal defeito (STEVENSON et al., 2000; CORTÉS et al., 2001; WILSON et al., 2003; BOTTO et al., 2004; SIRIKULCHAYANONTA et al., 2004).

Nos Estados Unidos, o suplemento de ácido fólico em pães e grãos implementada desde 1998, observou-se além da redução de alfa-fetoproteína no plasma materno, a diminuição da incidência de DTN (EVANS et al., 2004). Confirmando esses dados DE WALS et al. (2003), também relataram esta diminuição ao estudarem a população de Quebec, cuja incidência de 1.89/1000 no período de 1992-1997 para 1.28/1000 em 1998-2000, com diminuição de 32%. Achados da literatura mostram que mulheres que fizeram a suplementação de ácido fólico tem um risco menor de ter filhos com DTN do que mulheres que não fizeram a suplementação (NEVIN, 1988).

O folato está envolvido em dois ciclos intimamente relacionados: um envolve a biossíntese dos nucleotídeos (guanina, adenina e timina), essencial para a duplicação do DNA, e outro envolve a metabolização da metionina. Assim, ocorre o fornecimento de grupos metil a mais de 100 reações diferentes de transmetilação que podem envolver o DNA, RNA, proteínas, fosfolipídios e neurotransmissores.

O folato é convertido em tetraidrofolato (THF) que, por sua vez, é convertido em 5,10-metilenotetraidrofolato (MTHF). Parte do MTHF é convertida numa reação catalisada pela enzima 5,10-metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) a 5-metilenotetraidrofolato (5-Metil-THF), onde o radical metil é doado para remetilação reduzido a homocisteína a metionina (ROZEN, 1996; ESKES, 1997).

Da atividade reduzida da MTHFR, resulta um aumento da necessidade de consumo do ácido fólico, para manter normais as remetilações de homocisteína para metionina.

A hiperhomocisteinemia resulta da deficiência de folato devido à dieta inadequada ou a fatores genéticos relacionados com a sua metabolização, como mutações que codificam as enzimas redutase (MTHFR), a cistationina β -sintase (CBS), a metionina sintase (MTR) e a metionina sintase redutase (MTRR) (MILLS et al., 1995).

2.4.2 – Fatores genéticos associados aos DTN

2.4.2.1 – Genética Molecular

GOYETTE et al. (1994), isolaram o cDNA do gene da MTHFR humana e o localizaram na região do cromossomo 1p36.3. No ano seguinte, FROSST et al. (1995), identificaram a mutação pontual causadora da labilidade térmica no éxon 4 deste, e verificaram que ocorre uma substituição pontual que converte a Citosina (C) em Timina (T) no ponto 677 (C667T), havendo uma substituição do aminoácido alanina por valina na estrutura MTHFR.

A mutação C677T que produz diminuição da atividade desta enzima, diminuição de folato e aumento dos valores de homocisteína plasmática, é considerada o primeiro fator genético conhecido na etiologia dos DTN (VAN DER PUT et al., 1995; CALVO et al., 2002). Esses autores observaram alta frequência de portadores dessa mutação na população do México que possuem alta prevalência de DTN. Porém, KOCH et al. (1998) observaram na Irlanda, a manutenção das frequências elevadas de DTN e uma baixa frequência de portadores dessa mutação.

VAN DER PUT et al. (1995) analisando a frequência da mutação C667T no gene MTHFR em 55 pacientes com espinha bífida, 70 mães e 60 pais de afetados, e 207 controles normais, descreveram, uma possível relação entre a presença da mutação C667T e a ocorrência de DTN, uma vez que a frequência observada entre os afetados (12,7%) foi 2,3 vezes maior que encontrada no grupo controle normal (4,8%). WENSTROM et al. (2000), também descreveram essa associação entre a frequência do genótipo mutante sendo maior entre portadores de DTN do que na população normal.

A mutação do gene 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C-->T e elevado níveis de homocisteína parece estar associado com DTN que estende-se sobre a coluna lombar e encefalocele occipital. Ao contrário, a anencefalia e a exencefalia e os defeitos confinados ao sacro, apresentaram em muitos casos os alelos MTHFR normais e não podem se relacionados ao metabolismo alterado da homocisteína (WENSTROM et al., 2000). VAN DER PUT et al. (1995) e OU et al. (1996), também associaram fortemente este polimorfismo como um fator de risco para espinha bífida.

As diferentes características nutricionais, ambientais e genéticas de uma população poderiam explicar os distintos dados em diferentes áreas geográficas (GUEANT et al., 2003).

2.4.2.2 – Citogenética

Anomalias cromossômicas tem sido relacionadas aos DTNs, principalmente quando associados a outras malformações (SINGER et al., 1987; HUME et al., 1996; PHILIPP et al., 2003). KENNEDY et al. (1998) encontraram 6,5% de anomalias cromossômicas na avaliação de 212 casos de DTN diagnosticados no período pré-natal, sendo mais frequentes entre casos associados a outras malformações (27,3%) do que a defeitos isolados (2,4%).

SELLER (1995) analisou citogeneticamente fetos com DFTN e associou casos de espinha bífida com trissomia 13, trissomia 18 e triploidia; também foram observados casos de anencefalia com trissomia 18. COERDT *et al.* (1997) relataram a associação de

espinha bífida com monossomia X, encefalocele com trissomia 7 e iniencefalia com monossomia X. McFADDEN e KALOUSEK (1989) observaram a associação de espinha bífida com trissomia 16, encefalocele com monossomia 6, trissomia 14 e trissomia 15 em embriões abortados espontaneamente. SELLER et al. (2002) e NICKEL et al. (1994) associaram espinha bífida com a microdeleção 22q11. PHILLIP e KALOUSEK (2002) associaram espinha bífida e encefalocele com triploidia e trissomia do 14. DRUGAN et al. (1989) e BABCOOK et al. (2000) também relataram associações de aneuploidias com DTN.

CHEN et al. (2001) relataram um feto com anencefalia apresentando o cariótipo de novo 46,XX,r(13)(p11q32)/45,XX,-r(13). BENN et al. (1983) também relataram um feto com anencefalia apresentando o cariótipo 46,XY,r(13)(p11q13).

SINGER *et al.* (1987) descreveram uma família na qual 2 fetos com anencefalia foram identificados em 2 gestações sucessivas. O segundo feto, estudado citogeneticamente, apresentava cariótipo 46,XY,10q+. Análise do cariótipo materno identificou a constituição 46,XX,t(2;10)(p24;q26) demonstrando que o feto era portador de duplicação 2(p24-pter). HAHM *et al.* (1999) também analisaram um feto masculino apresentando anencefalia com trissomia parcial 2p21-2pter e monossomia 15q26-15qter. Vários autores têm sugerido, baseados em pacientes portadores de trissomia parcial 2p, que a ocorrência de DTN, especificamente a anencefalia, pode ser explicada por genes localizados na banda 2p24, os quais estão envolvidos no desenvolvimento do tubo neural (LURIE *et al.*, 1995; WINSOR *et al.*, 1997; DORAY ET AL., 2003; THANGAVELU et al., 2004). Outras associações entre DTN e anomalias em 2p também foram relatadas por THERKELSEN *et al.* (1973) - trissomia 2p13-p14 e espinha bífida, e CARRIERE (1975) - trissomia 2p23-pter e encefalocele.

Um caso raro também foi relatado por ZUMEL et al. (1989), em um feto masculino com anencefalia apresentando trissomia parcial 20p, produto de uma translocação materna 46,XX,t(15,20)(p11.2;p12).

Partindo da hipótese de que os tecidos envolvidos na malformação do tubo neural poderiam, à semelhança do que ocorre na carcionogênese, ter algum marcador citogenético detectável, HAUPT *et al.* (1995) estudaram 18 indivíduos afetados por

defeitos do tubo neural, a maioria deles representada por espinha bífida tipo mielomeningocele, através do cultivo dos tecidos oriundos do local da lesão e análise cromossômica desses tecidos. Desta amostra, uma translocação equilibrada – t(13;14), foi encontrada em um caso, porém esse rearranjo também foi observado no cariótipo do sangue periférico, indicando ser de fato uma alteração constitucional. Os autores afirmam que a maior parte dos tecidos cultivados derivou, por análise histológica, de tecidos fibrosos e não do tecido glial.

HERRERA et al. (1999) associaram perda de telômero, aumento da instabilidade cromossômica e perda de viabilidade da célula com defeitos do tubo neural. Interessantemente, os níveis mais altos de RNA telomerase (hTR) de embriões humanos é expresso ao sistema nervoso central (CNS), em particular nas células neuroepiteliais primitivas do tubo neural que circundam o canal neural (YASHIMA et al., 1998), insinuando um importante papel para a manutenção do telômero durante a formação do tubo neural e explicando a ocorrência desse fenótipo em consequência do encurtamento do telômero e perda do telômero (HERRERA et al., 1999). Alguns modelos em ratos também apresentaram anomalias cromossômicas como trissomia do 12 e 14 associadas com DTN em 100% e 50% dos embriões, respectivamente (PUTZ e MORRIS-KAY, 1981).

Anomalias cromossômicas numéricas podem passar despercebidas quando em estado de mosaico, pela citogenética convencional. Dessa forma, mosaicismos cromossômicos crípticos poderiam ser mais facilmente identificados coma utilização de FISH interfásico. JOHNSON et al. (2000) relataram algumas alterações cromossômicas têm sido detectadas apenas quando se utiliza FISH em núcleo interfásico. Esses autores relataram um caso de aparente mosaicismo confinado à placenta para a trissomia do cromossomo 16 num feto polimalformado. O exame posterior dos tecidos fetais utilizando a técnica de FISH em núcleo interfásico demonstrou baixos níveis de mosaicismo em todos os tecidos examinados, sugerindo que o uso do FISH interfásico permite a identificação de mosaicismo que as técnicas convencionais podem não identificar.

Mais recentemente, utilizando a técnica SKY (*spectral karyotype analysis*) REHEN et al. (2001) demonstraram cerca de 33% de aneuploidia cromossômica em neuroblastos, maduros ou em desenvolvimento, de camundongos. Interessantemente, a

prevalência de aneuploidia foi reduzida quando os autores utilizaram as células após cultivo com fator de crescimento de fibroblasto 2. Mais interessante ainda foi à demonstração que usando FISH nas células em interfase foram observadas taxas de aneuploidias semelhantes às encontradas com a técnica SKY.

FLANARY et al. (2004) utilizaram sondas teloméricas em células gliais de ratos, particularmente a microglia, que são tipos de células adultas do SNC, observaram que essas células exibem um alto potencial mitótico, e são assim suscetíveis ao encurtamento do telômero. YANG et al. (2003) e KAUSHAL et al. (2003), utilizando também a técnica de FISH identificaram aneuploidias em neurônios e glia em cérebros normais e demonstraram a ocorrência de defeitos de segregação mitótica em células normais do córtex cerebral de ratos.

O estudo citogenético desses defeitos, seja avaliando o cariótipo constitucional dos afetados, seja analisando os tecidos envolvidos na lesão pode contribuir para um maior conhecimento sobre os fatores biológicos associados a esse grupo de defeitos.

3- OBJETIVOS

1. Identificar a frequência de anomalias cromossômicas em fetos e RNs portadores de DTN, aparentemente de forma isolada;
2. Verificar a possível ocorrência de anomalias cromossômicas restritas ao tecido envolvido na lesão dos DTN utilizando técnicas de citogenética convencional e FISH do núcleo interfásico.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – DESENHO

Estudo de corte transversal.

Neste estudo avaliou-se o cariótipo constitucional bem como dos tecidos envolvidos na lesão do tubo neural de crianças portadoras de DTN por meio de análise citogenética convencional e FISH.

4.2 - TAMANHO AMOSTRAL

O cálculo de tamanho amostral sobre o número de indivíduos estudados não se aplica ao presente trabalho. Não há nenhuma evidência prévia na literatura sobre mosaicismo ou porcentagem de mosaicismo em células de tecidos envolvidos na lesão dos defeitos de fechamento de tubo neural utilizando a técnica de FISH pelo núcleo interfásico. A hipótese do presente trabalho de que células aneuplóides em estado de mosaicismo ou de cripto-mosaicismo podem estar associadas aos tecidos envolvidos na lesão dos DTN está baseada nas evidências desses achados em neuroblastos de camundongos (REHEN et al. 2001).

Baseado no trabalho de REHEN *et al.* (2001), estipulou-se em 300 o número de núcleos por sonda a ser analisado em cada caso.

4.3 – SELEÇÃO DE SUJEITOS E COLETA DE DADOS

Casos:

Fizeram parte deste projeto fetos e recém-nascidos portadores de DTN (anencefalia, espinha bífida e encefalocele) isolados que nascerem no CAISM, num período de 22 meses. Todos os propósitos foram examinados por um geneticista, conforme ocorre na rotina assistencial do Programa de Genética Perinatal. Os indivíduos foram selecionados nos locais onde habitualmente são examinados na rotina assistencial, ou seja os RN vivos

foram avaliados no Berçário e os natimortos bem como os óbitos neonatais precoces no Laboratório de Dismorfologia Perinatal (LDP).

A coleta do tecido envolvido na lesão foi feita pelo neurocirurgião quando da cirurgia corretiva nos casos das espinhas bífidas e das encefaloceles, com o cuidado de não retirar nenhuma amostra de tecido que pudesse ter conexão funcional. O tecido utilizado, portanto foi qualquer tecido nervoso ou fibroso envolvido na lesão. Tal procedimento foi realizado apenas por neurocirurgião no momento da cirurgia. Nos propósitos portadores de anencefalia ou craniorraquisque a coleta desse material foi feita pelo geneticista durante o exame dismorfológico no Laboratório de Dismorfologia Perinatal.

Controles:

Sangue de cordão umbilical de 10 RN (5 masculinos e 5 femininos) para avaliação das porcentagens de núcleos dissômicos e aneuplóides a partir da análise de FISH interfásico.

4.4 – VARIÁVEIS E CONCEITOS

Os dados clínicos foram coletados a partir das fichas do Programa de Genética Perinatal de todos os casos do presente trabalho (Anexo 4):

- Variáveis dependentes:
 - diagnóstico clínico do propósito segundo avaliação do geneticista;
 - sexo do propósito segundo avaliação da genitália externa em masculino, feminino ou ambíguo;
 - peso do propósito em gramas;
 - idade gestacional calculada a partir da DUM (data da última menstruação), ou pelas medidas obtidas na ecografia pré-natal ou ainda pelo método de Capurro;

- Idade Materna (IM) e Idade Paterna (IP)
- história familiar do propósito (consanguinidade, recorrência familiar de DFTN, outras malformações na família).
- Variáveis independentes:
 - cariótipo obtido a partir da análise do sangue ou da pele e cariótipo obtido a partir da análise citogenética convencional do tecido envolvido na lesão. Conforme rotina do programa de Genética Perinatal, o resultado de cariótipo é decorrente da análise de 5 núcleos metafásicos e contagem do número de cromossomos em 11 células. A nomenclatura utilizada segue a recomendada pelo International System for Human Cytogenetic Nomenclature – ISCN (1995);
 - cariótipo obtido a partir da análise do FISH interfásico. Porcentagem de núcleos interfásicos que apresentam 2 ou mais sinais fluorescentes, correspondentes às regiões centroméricas hibridizadas com as sondas específicas. O resultado (normal ou aneuplóide) foi obtido após comparação com as porcentagens obtidas no estudo citogenético molecular dos pacientes controles.

4.5 – TESTES, TÉCNICAS E EXAMES

4.5.1 - Avaliação clínica

Como já referido, os RN vivos foram submetidos, conforme rotina, a exame genético-clínico no Berçário. Entre os natimortos ou recém-nascidos que evoluíram precocemente com óbito neonatal, os mesmos foram examinados no Laboratório de Dismorfologia Perinatal (LDP)- CAISM.

Cada propósito teve avaliação do cariótipo constitucional a partir dos linfócitos do sangue periférico ou do cordão umbilical e do tecido envolvido na lesão pelas técnicas de citogenética convencional e FISH do núcleo interfásico.

4.5.2- Avaliação laboratorial

A) Citogenética convencional:

➤ **Linfócitos:**

Foi utilizada a técnica de obtenção de metáfases a partir do cultivo de linfócitos de sangue periférico ou sangue de punção cardíaca a partir de protocolo utilizado na rotina do Laboratório de Citogenética do CAISM (técnica modificada de MOORHEAD et al,1960), a qual é descrita a seguir.

- Cultura: adicionou-se cerca 15-20 gotas de sangue total heparinizado e 0,1ml de fitohemaglutinina (Gibco) em frascos de cultura contendo 5 ml de meio de cultura RPMI 1690 com 10% de soro fetal bovino. Esses frascos foram então colocados em estufa à 37°C por 72 horas. De 30 a 45 minutos antes do fim desse período, acrescentou-se 0,1 ml de colchicina $4 \times 10^{-5}M$ ou 0,1 ml de colcemid ao meio de cultura. Ao final do período de incubação, retirou-se os frascos da estufa agitando-os levemente e em seguida transferiu-se o seu conteúdo para tubos cônicos os quais são submetidos à centrifugação por 10 minutos a 1.000 rpm. Ao final desta o sobrenadante foi retirado e desprezado.

- Hipotonia: utilizou-se solução hipotônica de KCL 0,075M aquecida à 37°C°. Acrescentou-se a cada tubo 5,0 ml dessa solução agitando-se delicadamente os tubos. Incubou-se a 37°C° por cerca de 30 minutos, repetindo a agitação dos tubos a cada 5 minutos. Terminado esse tempo à hipotonia foi interrompida com 0,5 ml de fixador (metanol + ácido acético 3:1).

- Fixação: centrifugou-se o material por 10 minutos a 1.000rpm. Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento com pipeta Pasteur. Colocou-se, gotejando, 4 ml de fixador no tubo. Ressuspendeu-se o material e centrifugou-se o mesmo a 1.000 rpm

por 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento por mais 3 vezes. Após a última lavagem com fixador, deixou-se uma quantidade de sobrenadante proporcional ao sedimento.

- Preparação das lâminas e coloração: em lâminas limpas pingou-se 2-3 gotas do material ressuspense sobre a lâmina levemente inclinada deixando-a secar a temperatura ambiente. A coloração foi feita pela técnica de bandamento G, descrita por SCHERES (1972). As lâminas foram imersas em solução 0,1 % tampão fosfato, pH 6,8, por alguns segundos. As mesmas foram lavadas em água destilada e coradas com Giemsa, por 5 minutos.

➤ **Tecido:**

Para as culturas de longa duração (pele e tecido envolvido na lesão) utilizou-se a técnica do explante (pele) ou de dissociação enzimática com tripsina (tecido da lesão), respectivamente. Na primeira, pequenos fragmentos do tecido em questão, previamente cortados, foram colocados em frascos de cultura com uma pequena gota de meio completo (Ham F10 enriquecido com 30% de soro bovino fetal). Após o 3º dia de incubação, em sistema fechado, em estufa a 37°C, foram adicionados cerca de 4ml de meio de cultura completo a cada frasco de cultura. A partir daí os frascos foram examinados a cada 2-3 dias e quando o frasco apresentou-se com uma monocamada de células confluentes e com uma porcentagem de 70% de índice mitótico a retirada dessas culturas fez-se com adição de 0,1-0,2ml colchicina por cerca de 4 horas seguida de tripsinização (Solução de tripsina com EDTA) para descolamento da monocamada de células. Os demais passos para retirada foram realizados de modo semelhante ao utilizado para a retirada das culturas de linfócitos.

Na técnica da dissociação enzimática por tripsina, lavou-se o tecido a ser cultivado colocando 2ml de Hank's em placa de petri estéril. Quando necessário fez-se lavagens sucessivas do tecido para a retirada de maior quantidade de sangue. Transferiu-se o tecido para outra placa contendo 2ml de Ham F-10 e adicionou-se 2ml de tripsina a 37°C. Cortou-se o tecido em fragmentos pequenos por 3 minutos nesta solução. Após esse tempo colocou-se nesta placa 2-3ml de meio completo (30% SFB + 70% Ham F-10) para inativar a ação da tripsina. Transferiu-se o conteúdo desta placa para um tubo cônico e centrifugou-

se por 10 min. No fluxo laminar, retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se os fragmentos de tecido com 8 ml de meio AmnionMAX com 30% de suplemento AmnionMAX (5,6 ml de meio e 2,4 ml suplemento). Distribuiu-se a suspensão em 2 frascos de cultura colocando 4 ml em cada frasco. Colocou-se na estufa de CO₂. No começo, trocou-se meio de cultura a cada 3-4 dias, depois de aproximadamente 20-30% de crescimento, trocou-se meio a cada 2 dias. Quando o frasco apresentou uma monocamada de células confluentes e com um bom índice mitótico, fez-se a adição de 0,1ml de colcemid (GIBCO) por cerca de três horas e meia, seguida de tripsinização para descolamento da monocamada de células. Os demais passos para retirada foram realizados de modo semelhante ao utilizado para a retirada das culturas de sangue. Os pellets foram armazenados para a técnica de FISH.

De cada caso foram avaliadas 16 metáfases, sendo 5 analisadas seguindo o critério ISCN (1996), pela técnica de bandamento GTG, em microscópio comum.

B) Técnica de citogenética molecular do núcleo interfásico:

Para essa técnica utilizou-se os *pellets* armazenados oriundos do cultivo celular do tecido envolvido na lesão.

Para a preparação do FISH foi utilizado o protocolo da Cytocell para o sistema de *multiprobes* com lâminas devidamente marcadas com sondas alfa-centroméricas dos cromossomos um a vinte e dois, X e Y, sendo que as sondas dos cromossomos: 13/21 e 14/22, foram utilizadas em conjunto, devido à alta homologia das seqüências de DNA satélite presentes nos centrômeros desses cromossomos.

1. Preparação da lâmina

As lâminas, previamente limpas com etanol a 70%, foram preparadas de modo que a concentração das amostras tivesse uma densidade celular adequada – não inferior a 20 núcleos por campo à observação microscópica (microscopia de fase) com a objetiva de 10x. Utiliza-se 2 µl de cada amostra em cada coluna de 3 quadradinhos da lâmina.

OBS: A lâmina com as sondas foram preparadas como no esquema abaixo, cada quadrado contendo sonda de um cromossomo ou grupos de cromossomos específicos.

	1	2	3	4	1/5/19	6	7	8
	9	10	11	12	13/21	14/22	15	16
	17	18	1/5/19	20	13/21	14/22	X	Y

2. Protocolo de Hibridização in situ utilizando-se o Sistema Multiprobe da Cytocell

A lâmina contendo as amostras foi submetida à lavagem e numa solução de 2xSSC por 23 min. Após secagem, foi desidratada em uma série de álcoois (70%, 85% e etanol absoluto) por 2 min cada. Após secagem pingou-se 1µl da solução de hibridização pré-aquecida (37°C) e em seguida recobriu-se a preparação a lâmina contendo as sondas também previamente aquecida (37°C). A preparação foi então submetida à desnaturação por aquecimento (75° C) em placa aquecida própria durante 6 minutos. Após esse tempo, procedeu-se a fase de hibridação na câmara de hibridação em estufa à 37°C *overnight* (18 horas).

Após a hibridação, retirou-se a lâmina que continha as sondas de cima da lâmina de análise. Esta foi então lavada com solução de 0,4xSSC (pH7,0) à 72°C por 2 minutos e, em seguida uma lavagem em 2xSSC e 0,05% de Tween 20 (pH 7,0) a temperatura ambiente por 30 segundos. Removeu-se o excesso de líquido evitando a secagem da lâmina e então adicionou-se 20 µl da solução DAPI-Antifade PI sobre as duas extremidades da lâmina e cobriu-se a mesma com uma lamínula. A lâmina foi deixada por pelo menos 10 minutos em ambiente escuro, antes da observação ao microscópio de epifluorescência.

OBS: Os sinais então foram contados em pelo menos 300 núcleos por box.

4.6 – PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram obtidos por visualização das amostras utilizando-se microscopia epifluorescência, em microscópio Zeiss Axiophot 2.

Para interpretação dos sinais de hibridação em núcleo interfásicos foram seguidos critérios: não foram considerados sinais com superposição ou pontos fluorescentes desiguais, nem foram contados sinais fracos de hibridação (RAMOS, 1999).

Os testes estatísticos aplicados referem-se à análise dos valores obtidos na análise citogenética molecular. A média e o desvio padrão foram calculados pela porcentagem de núcleos apresentando um, dois ou três sinais de hibridização para a sonda utilizada. O limite superior de referência, que corresponde ao intervalo de confiança de 95% foi calculado a partir dos resultados obtidos dos sinais diplóides dos 10 casos controles. O limite de referência superior estabelece o menor nível de trissomia que pode ser detectado pela sondas (JALAL et al., 1998).

5- RESULTADOS

Durante o período de 22 meses (03/02 a 01/04), foram avaliadas um total de 41 crianças portadoras de DTN, aparentemente isolado, que nasceram no CAISM/UNICAMP (Anexo 5). A distribuição dessas crianças segundo o tipo de lesão pode ser visto na Tabela 1, compreendendo: 18 anencefalias (44%), das quais 5 eram craniorraquisquis, 13 espinhas bífidas (32%), 6 encefalocelos occipitais (14%) e 4 iniencefalias (10%)

Tabela 1 – Distribuição da amostra de acordo com o tipo de defeito do tubo neural

DTN	Frequência	%
Anencefalia	13	32
Craniorraquisquise	5	12
Encefalocele	6	14
Espinhas Bífidas		
Torácica	1	3
Tóraco-Lombar	3	7
Tóraco-Sacral	2	5
Lombossacra	6	14
Sacral	1	3
Iniencefalia	4	10
Total	41	100,0

5.1 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICAS DA AMOSTRA

Dos 41 portadores de DTN avaliados, 28 (68%) eram, de fato, DTN isolado e 13 (32%) apresentaram associação com outras malformações maiores, sem, contudo, constituir um caso sindrômico. A distribuição dos 41 casos de DTN segundo características clínicas está relacionada no Anexo 5, sendo 19 (46%) nativos, 11 (27%) natimortos e 11 (27%) que evoluíram com óbito neonatal precoce. Todos os recém-nascidos portadores de espinha bífida nasceram vivos.

A distribuição por sexo mostrou a prevalência de sexo feminino (75%) no total da amostra e para os diversos tipos de DTN, exceto para a espinha bífida (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição dos tipos de lesões em relação ao sexo

Tipo de DTN	SEXO (%)	
	Masculino	Feminino
Anencefalia	2 (5)	16 (39)
Encefalocele	1 (3)	5 (12)
Espinha Bífida	6 (14)	7 (17)
Iniencefalia	1 (3)	3 (7)
Total	10 (25)	31 (75)

O peso médio dos indivíduos da amostra com DFTN foi de 2.141g (DP=834g). Observou-se peso menor entre as anencefalias (1.148g) (DP=736g) do que entre as encefaloceles (2.873g) (DP=687g) e as espinhas bífidas (3.063g) (DP=674g).

A média da Idade Gestacional foi de 30 semanas (DP=5,6) para portadores de anencefalia e craniorraquisquise, 37 semanas (DP=4,2) para portadores de encefalocele, 38 semanas (DP=3,3) para portadores de espinha bífida e 31 semanas (DP=3,9) para iniencefalia.

A idade materna variou de 15 a 42 anos, sendo que 37% da amostra era constituída por mulheres com idade inferior a 20 anos.

Não se observou consangüinidade parental em nenhum dos casos da presente amostra. Quanto à recorrência de outros casos de DTN entre os 41 estudados, observou-se que 4 (10%) deles referiram recorrência de DTN. Em 3 (7%) famílias, nas quais já havia relato de filhos com anencefalia, o mesmo defeito voltou a repetir. Em 1 família (3%) cujo propósito era portador de espinha bífida, dois outros casos de espinha bífida foram relatados em primos de 2º grau pelo lado paterno. Por último, em 18 (44%) famílias outras anomalias foram referidas (Anexo 5).

5.2 – ANÁLISE CITOGENÉTICA E FISH

5.2.1 – Controle

A análise pelo FISH interfásico foi realizada em 10 indivíduos controles a fim de estabelecer o intervalo de confiança (IC) e a média dos sinais diplóides. O resultado dessa análise pode ser visto na Tabela 3. Todas as sondas alfa-centroméricas mostraram intervalos de confiança estreito com médias próximas a 100%. O número absoluto de um, dois, três ou mais sinais de hibridização para cada sonda utilizada, na amostra controle, pode ser vista no Anexo 6. A maioria dos núcleos apresentou sinais diplóides.

Tabela 3 – Média e Intervalo de confiança das marcações diplóides para cada cromossomo estudado a partir das suas respectivas sondas alfa-centroméricas, no grupo controle.

Intervalo de Confiança				
de 95%				
Cromossomo	Sondas	Média	Limite Inferior	Limite Superior
CR1	D1Z1	99,1	98,8	99,5
CR2	D2Z2	100,0	99,9	100,0
CR3	D3Z1	99,9	99,8	100,0
CR6	D6Z1	99,7	99,5	99,9
CR7	D7Z1	96,5	98,9	100,0
CR8	D8Z2	99,8	99,7	100,0
CR9	D9Z3	99,1	98,9	99,4
CR10	D10Z1	99,6	99,4	99,9
CR11	D11Z1	99,9	99,8	100,0
CR12	D12Z3	99,9	99,7	100,0
CR13 *	D13Z1/D21Z1	98,4	97,7	99,1
CR14 *	D14Z1/D22Z1	97,9	97,5	98,4
CR15	D15Z4	98,9	98,7	99,2
CR16	D16Z2	99,3	99,1	99,5
CR17	D17Z1	99,2	99,0	99,4
CR18	D18Z1	99,5	99,3	99,7
CR21 *	D13Z1/D21Z1	98,9	98,1	99,7
CR22 *	D14Z1/D22Z1	98,7	98,1	99,3
CRX1	DXZ1	99,8	99,6	100,0
CRX2	DXZ1	99,8	99,6	100,0
CRY1	DYZ1	99,5	99,3	99,7

* Todos os autossomos apresentam 2 sinais, com exceção dos cromossomos 13, 14, 21 e 22 que apresentam 4 sinais.

Além dos IC, os limites superiores para 1 marcação (indicativo de monossomia) e para 3 marcações (indicativo de trissomia) foram calculados pela fórmula $x + 2DP$, onde x é a média e DP é o desvio padrão. Esses valores são mostrados na tabela 4. Uma porcentagem de núcleos com 1 e/ou 3 marcações que apresentaram limites superiores maiores que 4% de $x + 2DP$ pode ser observada nos cromossomos 15, 17 e 18 das tabelas 11, 8 e 6, respectivamente, marcados em vermelho.

Para os cromossomos 13 (13/21), 14 (14/22), 21 (13/21) e 22 (14/22), que possuem marcação cruzada, os limites superiores para 3 marcações foi o indicativo de monossomia e para 5 marcações foi o indicativo de trissomia.

Tabela 4 – Média, Desvio Padrão e $x + 2DP$ das marcações monossômicas e trissômicas para cada cromossomo estudado

Cromossomo	Sinais	Média (x) (%)	Desvio Padrão (DP) (%)	x+2DP (%)
CR1	1	0,8	0,5	1,8
	3	0,1	0,3	0,7
CR2	1	0,0	0,0	0,0
	3	0,0	0,0	0,0
CR3	1	0,1	0,2	0,5
	3	0,0	0,0	0,0
CR6	1	0,3	0,3	0,9
	3	0,0	0,0	0,0
CR7	1	0,0	0,0	0,0
	3	0,1	0,2	0,5
CR8	1	0,2	0,2	0,6
	3	0,0	0,0	0,0
CR9	1	0,8	0,4	1,6
	3	0,1	0,1	0,3
CR10	1	0,2	0,2	0,6
	3	0,2	0,4	1,0
CR11	1	0,1	0,2	0,5
	3	0,0	0,0	0,0
CR12	1	0,1	0,2	0,5
	3	0,0	0,0	0,0
CR13	3	1,3	1,1	3,5
	5	0,0	0,0	0,0
CR14	3	1,6	0,7	3,0
	5	0,2	0,2	0,6
CR15	1	1,1	0,3	1,7
	3	0,0	0,0	0,0
CR16	1	0,6	0,2	1,0
	3	0,2	0,2	0,6
CR17	1	0,8	0,3	1,4
	3	0,0	0,0	0,0
CR18	1	0,5	0,3	1,1
	3	0,1	0,1	0,3
CR21	3	1,1	1,2	3,6
	5	0,1	0,1	0,3
CR22	3	0,9	0,9	2,7
	5	0,1	0,3	0,7

*CR = cromossomo

5.2.2 – Amostra

A padronização da técnica de cultura de tecido cérebro-vascular, bem como, obtenção de metáfases e suspensão celular a partir desse tecido, foi realizada durante um período de 6 meses. As células provenientes do cultivo celular desse tecido (Figura 6), apresentaram morfologia estrelada, dotada de numerosos prolongamentos curtos e longos, semelhante às células da glia do sistema nervoso.

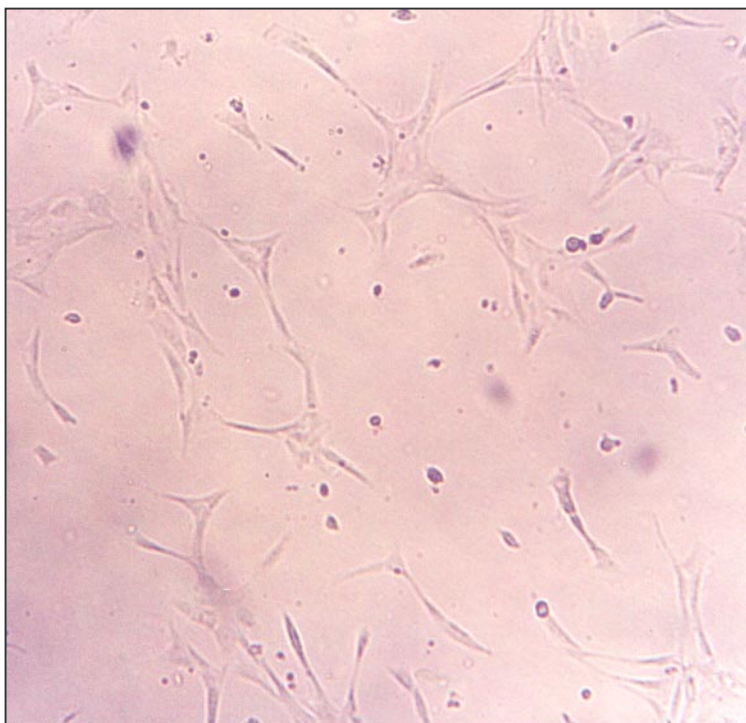


Figura 6 – Células aderentes, provenientes de tecido cérebro-vascular, após 8 dias de cultivo

Com o sistema multiprobe utilizado, todos os cromossomos, através de suas sondas alfa-centroméricas deveriam ter sido estudados. No entanto, algumas sondas D4Z1, D5Z1, D19Z1 e D20Z1, respectivamente dos cromossomos 4, 5, 19 e 20 não apresentaram marcação adequada, e portanto não puderam ser consideradas no presente estudo.

Os resultados apresentados se referem, portanto, a investigação de 18 cromossomos através de suas respectivas sondas alfa-centroméricas para pesquisa de anomalias cromossômicas numéricas.

De acordo com a análise de cada caso, a presente amostra foi dividida em 3 grupos: **(Grupo 1)** casos para os quais o estudo completo foi possível, ou seja, tem-se disponível os resultados da citogenética convencional a partir dos linfócitos do sangue periférico e do tecido cérebro-vascular, além da análise por FISH interfásico das células desse último tecido – 13 casos (32%), **(Grupo 2)** estudou-se o cariótipo do tecido cérebro-vascular – 5 casos (12%), e **(Grupo 3)** estudou-se o cariótipo a partir de linfócitos do sangue periférico – 23 casos (56%).

5.2.2.1 – Grupo 1- Pacientes com investigação completa: Cariótipo constitucional, cariótipo e avaliação de FISH interfásico do tecido cérebro-vascular

Os resultados desse grupo estão referidos na Tabela 5. No caso 5 (1551) não foi possível estudar a amostra de sangue porque o feto morreu precocemente não sendo possível uma amostra de sangue, então se estudou o cariótipo constitucional desse feto a partir de fibroblastos de pele. O caso 12 não apresenta análise por FISH devido à insuficiência de material.

Pela citogenética convencional, dos 13 casos avaliados, 11 pacientes apresentaram cariótipo normal e 2 pacientes apresentaram alteração cromossômica no tecido envolvido da lesão (Tabela 5). O cariótipo de sangue foi normal em todos os 13 casos, exceto no caso 5 (RF 1551) que apresentou mosaicismo tetraplóide/diplóide na pele estudada (Tabela 5).

Nos casos da presente amostra que apresentaram alterações cromossômicas na análise por citogenética convencional, um maior número possível de metáfases foi analisado.

Os resultados da análise por FISH interfásico dos tecidos CV de cada paciente são mostrados na Tabela 6. A análise por FISH interfásico investigando 18 cromossomos através de suas sondas alfa-centroméricas, mostrou alterações numéricas em estado de mosaicismo em 3 casos (Tabela 6). O caso 3, apresentou apenas uma marcação com a sonda do cromossomo 6 (D6Z2) em 62% (290/470 núcleos) (Tabela 6 e Figura 7). Os outros casos, 9 (Figura 8) e 10, mostraram mosaicismo 4N/2N com 5 e 4% dos núcleos tetraplóides, respectivamente), também identificado pela citogenética convencional (30 e 37%, respectivamente). No caso 10, também foram encontrados 5 sinais fluorescentes em maior porcentagem do que 4 sinais que seriam esperados (Figura 9).

Conforme pode ser visto na Tabela 6, alguns casos apresentam sinais diplóides com uma porcentagem que varia de 5 a 13% fora do IC dos controles. Isso acontece principalmente nos quadrantes das sondas 13/21 e 14/22. Outros casos também apresentam essas porcentagens, fora do IC dos controles, nos cromossomos 15, 17 e 18 (marcados em azul na Tabela 6, 8 e 11).

O resumo clínico dos casos que apresentaram anomalias cromossômicas estão no Anexo 7.

O mosaico 4N/2N identificado na análise dos fibroblastos por citogenética convencional foi de 31% e confirmado por FISH interfásico com uma porcentagem de 9% de núcleos tetraplóides (Figura 10). A análise do tecido CV, desse mesmo caso, por citogenética convencional e FISH foram normais.

O caso 4 (RF 1512), apresentou duas linhagens celulares, uma normal e outra com monossomia do cromossomo 8 com uma porcentagem de 6% dos 54 núcleos analisados. Porém, devido à insuficiência de material para aumentar o número de células analisadas, e o fato da análise por FISH ter sido nulo, esse caso não foi considerado como anormal (Tabela 6 e Figura 11).

A porcentagem de anomalias cromossômicas encontrada foi de 8% quando considerada a citogenética convencional em tecido sanguíneo ou pele. No tecido cérebro-vascular, a porcentagem de anomalias foi de 15% pela análise convencional e 25% através do FISH interfásico.

Tabela 5 – Relação dos 13 casos estudados de acordo com o cariótipo constitucional (sangue ou pele) e cariótipo do tecido cérebro-vascular. Todos os casos estão referidos de acordo com o tipo de defeito e o resultado da análise de FISH interfásico

Citogenética					
Caso	RF	DTN	sangue	Cérebro vascular	FISH**
1	1454	Iniencefalia	46,XX	46,XX	N
2	1657	anencefalia	46,XX	46,XX	N
3	1473	anencefalia	46,XY	46,XY	nuc ish 6cen(D6Z2x1)[62]/ (D6Z2x2)[38]
4	1512	anencefalia	46,XX	45,XX,-8/46,XX (3:51)	N
5	1551	anencefalia	92,XXYY/46,XY (47:103) *	46,XY	N
6	1521	craniorraquisquise	46,XX	46,XX	N
7	1568	EB TS	46,XY	46,XY	N
8	1434	EB TL	46,XX	46,XX	N
9	1558	EB TL	46,XX	92,XXXX/46,XX (17:40)	4N/2N
10	1583	EB LS	46,XY	92,XXYY/46,XY (13:22)	4N/2N
11	1561	EB LS	46,XX	46,XX	N
12	1607	EB LS	46,XX	46,XX	-
13	1653	EB LS	46,XY	46,XY	N
Porcentagem de aneuploidia			8%	15%	25%

* biópsia de pele.

**Análise de FISH sendo: N= normal

Tabela 6 - Resultado da análise do FISH interfásico do tecido cérebro-vascular dos 18 casos estudados de acordo com o número de sinais encontrados em cada cromossomo

Caso	RF	Cromossomos (%)																**				X	Y
1	1454	1	2	3	6	7	8	9	10	11	12	15	16	17	18	13	14	21	22				
	1	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1	2	1	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	99	99	94	98	98	95	99	97	95	96	97	96	99	94	1	1	1	1	98	0		
	3	-	-	3	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	3	5	3	4	-	-		
	4	1	1	3	2	1	3	1	3	3	2	-	2	-	3	95	92	95	93	2	-		
	+															1	2	1	2				
2	1657																						
	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	-	2	2	-	-	-	-	1	-		
	2	97	99	99	99	99	99	98	98	99	98	99	99	96	98	1	-	-	-	99	0		
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	-	-		
	4	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	2	-	97	98	98	97	-	-		
	+															-	-	-	1				
3	1473																						
	1	1	2	-	62	-	1	1	-	-	-	-	1	2	2	-	-	-	-	97	98		
	2	96	97	98	38	99	98	97	98	99	98	98	97	97	95	-	-	-	-	3	2		
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	4	3	1	2	-	1	1	2	2	1	2	2	2	1	3	-	-	-	-	-	-		
	+																						
4	1512																						
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-		
	2	99	99	100	98	98	98	99	97	99	99	99	98	97	99	1	1	-	1	99	0		
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	2	1	1	1	-	-		
	4	1	1	-	2	2	2	1	3	1	1	-	2	1	1	94	97	98	98	1	-		
	+															3	1	1	-				
5	1551																						
	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	99	99		
	2	99	100	100	98	99	98	99	97	98	99	99	98	97	99	-	1	-	-	1	1		
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	2	1	1	3	-	-		
	4	1	-	-	2	1	2	1	2	2	1	-	2	1	1	98	98	98	97	-	-		
	+															-	-	1	-				
5 ^a	1551p																						
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	2	-	-	-	-	88	88		
	2	89	93	-	94	99	93	81	81	93	92	91	99	91	90	-	-	-	-	12	12		
	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	1	2	3	1	-	-		
	4	8	7	-	6	1	7	9	9	7	7	8	1	7	8	86	80	86	86	-	-		
	+	1(6)														2(6)/1 1(8)	18	4(6)/7 (8)	13				

Casos	RF	Cromossomos (%)														**				X	Y
6	1521	1	2	3	6	7	8	9	10	11	12	15	16	17	18*	13	14	21	22		
	1	-	1	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	98	-	-	-	97	-	99	-	99	-	97	95	94	-	-	-	-	95	0
	3	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	1	-
	4	-	-	-	-	-	2	-	-	-	1	-	2	2	5	-	-	-	-	4	-
	+	1(5)																			
7	1568																				
	1	-	1	2	1	1	-	-	-	-	1	-	2	1	2	-	-	-	-	99	99
	2	99	98	98	97	97	98	99	99	99	99	99	97	98	96	-	-	-	1	1	1
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	2	2	-	-	-
	4	1	1	-	2	2	2	1	1	1	-	1	1	0	1	97	97	98	98	-	-
	+															3	1	-	1		
8	1434																				
	1	-	1	3	1	1	-	-	-	-	1	-	2	1	2	-	-	-	-	1	-
	2	99	98	96	97	97	98	99	99	99	99	99	97	98	96	-	-	-	1	98	0
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	5	-	-
	4	1	1	1	2	2	2	1	1	1	-	1	1	0	1	97	97	99	93	1	-
	+															3	3	-	1		
9	1558																				
	1	1	2	1	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	2	96	94	90	98	98	89	97	97	96	97	-	95	94	92	-	-	-	-	97	0
	3	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	3	7	3	-	-
	4	3	3	8	2	2	11	2	3	4	3	-	4	5	7	87	92	84	93	3	-
	+															8	5	9	4		
10	1583																				
	1	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-
	2	-	92	89	97	99	96	96	97	92	96	-	-	97	88	-	1	-	1	-	-
	3	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	5	1	5	-	-
	4	-	8	10	3	1	3	4	2	8	4	-	-	3	3	9	85	7	89	-	-
	+															91	9	92	5		
11	1561																				
	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1	-	3	-	-	-	-	-	-
	2	100	99	97	100	100	99	99	99	99	99	97	98	99	95	-	-	-	-	99	0
	3	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2	5	5	6	1	-
	4	-	-	1	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	2	98	94	94	94	-	-
	+															-	1	1	-		
13	1653																				
	1	2	1	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	98	97
	2	97	98	96	97	97	97	99	97	99	98	97	98	93	98	1	-	-	-	2	3
	3	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	2	-	7	1	5	2	-	-
	4	1	1	3	2	3	3	1	2	1	2	1	1	4	1	89	99	93	98	-	-
	+															3	-	2	-		

* Marcado em azul: porcentagem de núcleos diplóides fora do IC dos controles;

Marcado em vermelho: porcentagem de núcleos monossômico e trissômico maior que x+2DP dos controles.

** Todos os autossomos apresentam 2 sinais, com exceção dos cromossomos 13, 14, 21 e 22 que apresentam 4 sinais.

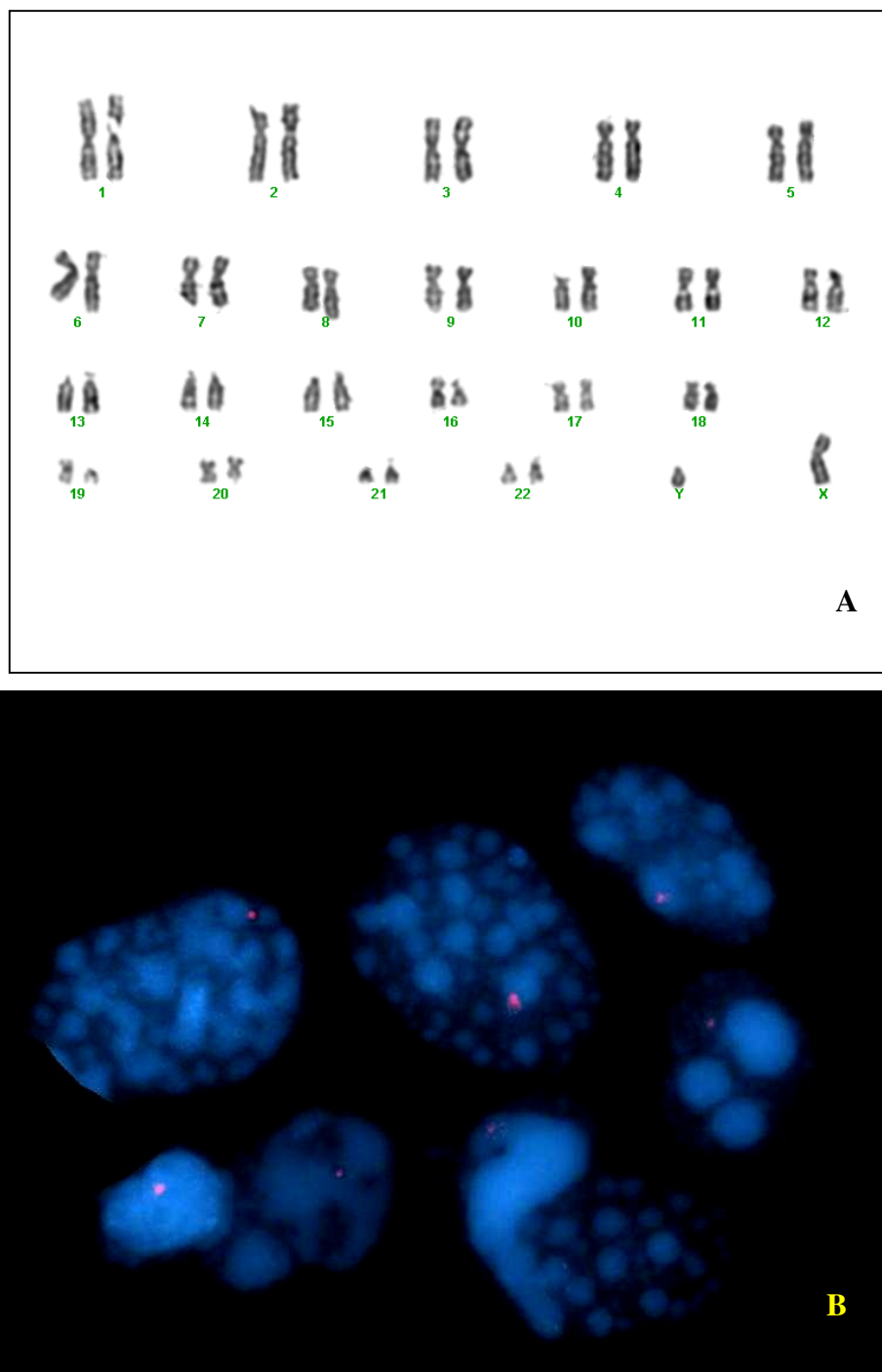


Figura 7 – Caso 3: estudo do tecido cv. A) Cariótipo convencional normal do tecido cv; B) Núcleos interfásicos marcados com a sonda D6Z2 mostrando um sinal do cromossomo 6.

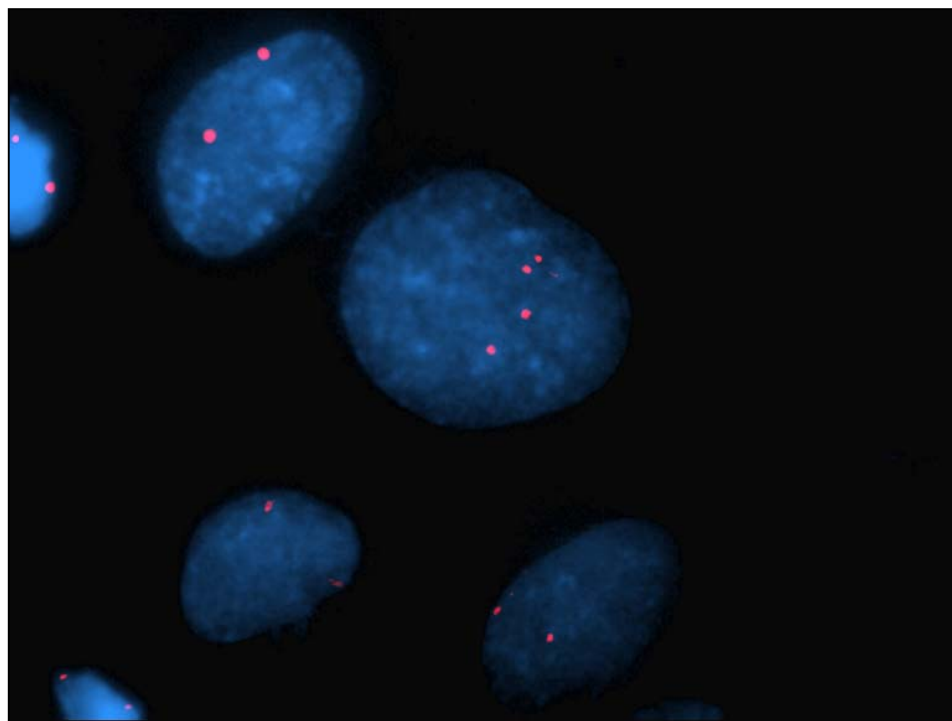
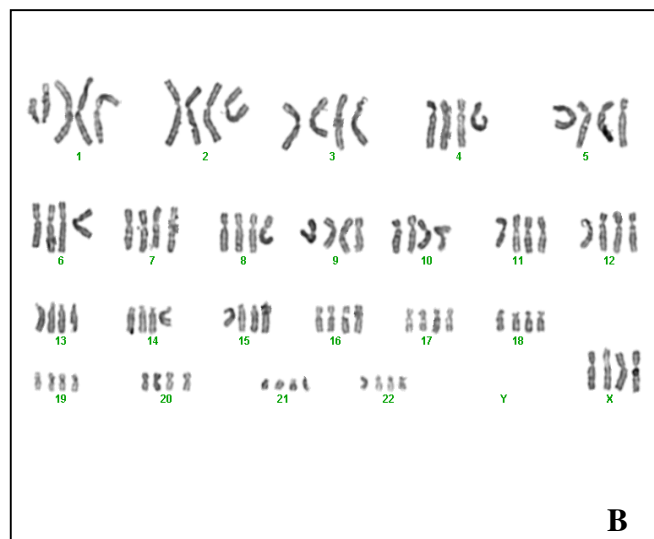
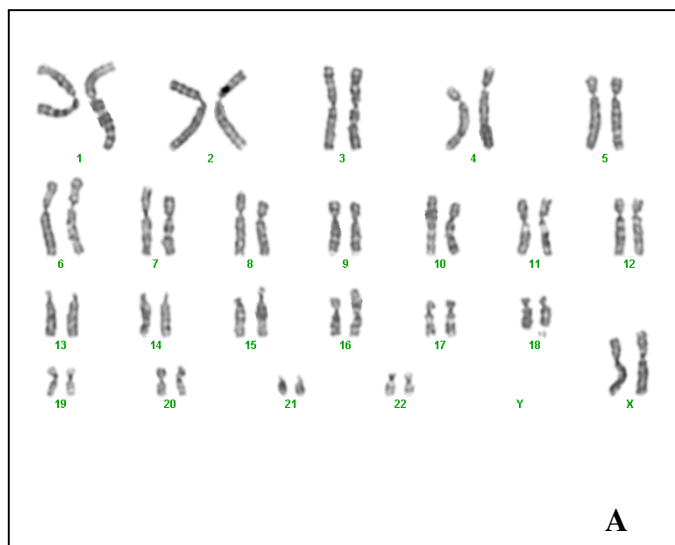


Figura 8 – Caso 9: Estudo do tecido cv. A) Cariótipo 46,XX; B) Cariótipo 92,XXXX; e C) Núcleos interfásico marcados com sonda alfa-centroméricas do cromossomo 10 (D10Z1), apresentando 2 sinais e 4 sinais, confirmando o cariótipo 2N/4N.

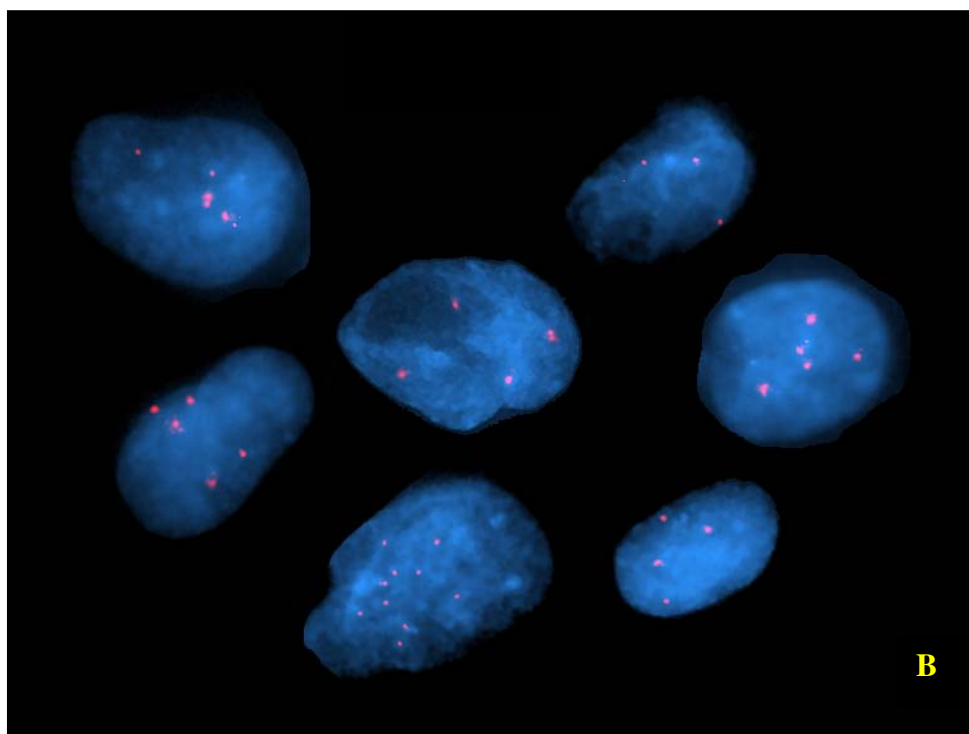
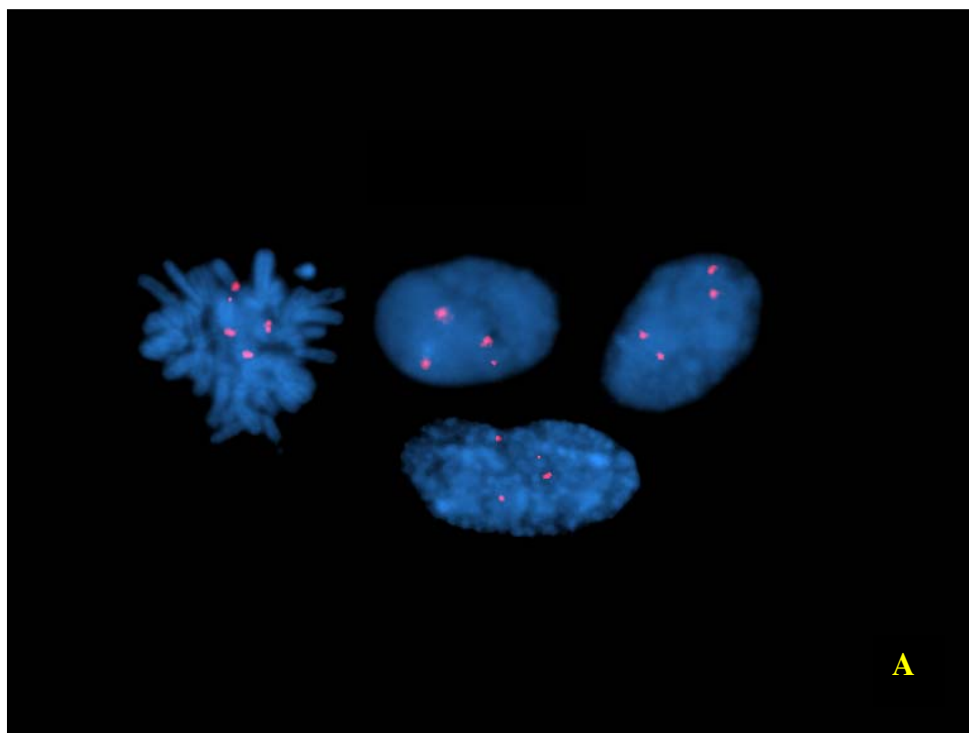


Figura 9 – Caso 10: Estudo do tecido cv. Núcleos interfásico marcados com sonda alfa-centroméricas do cromossomo 13/21 (D13Z1/D21Z1). A) Núcleos normais apresentando 4 sinais; B) Núcleos apresentando 4, 5 e 10 sinais.

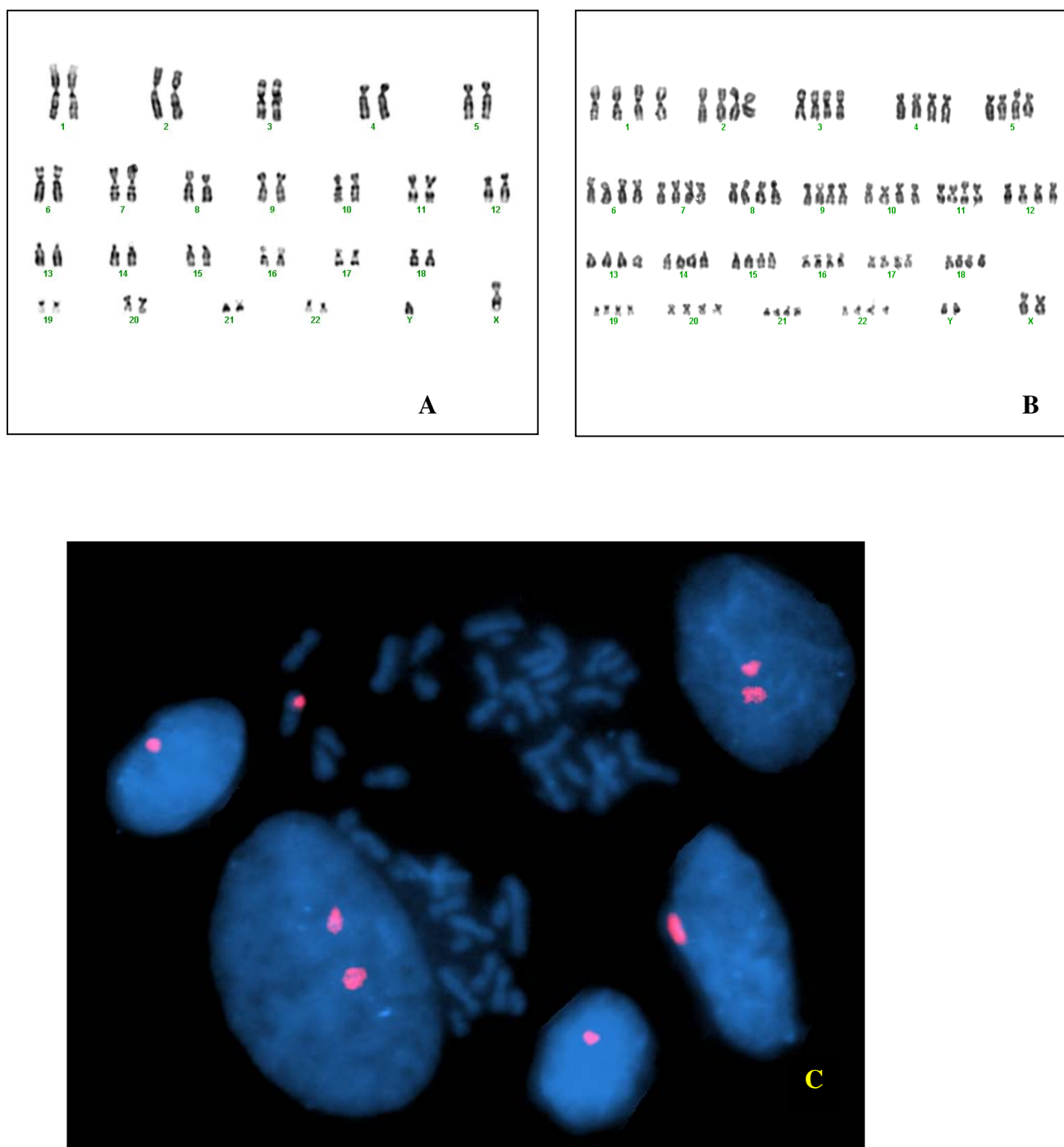


Figura 10 - Estudo da biópsia de pele. A) Cariótipo 46,XY; B) Cariótipo 92,XXYY; e C) Metáfase e núcleos interfásico marcados com sonda alfa-centroméricas do cromossomo Y (DYZ1), apresentando 1 sinal e 2 sinais, confirmando o cariótipo 2N/4N.

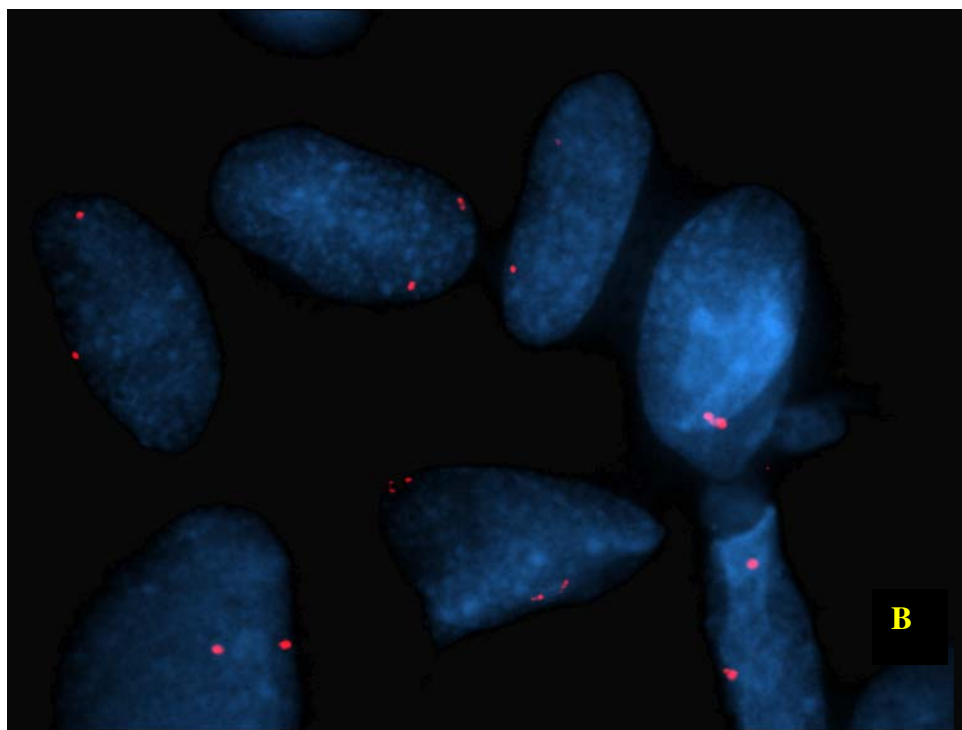
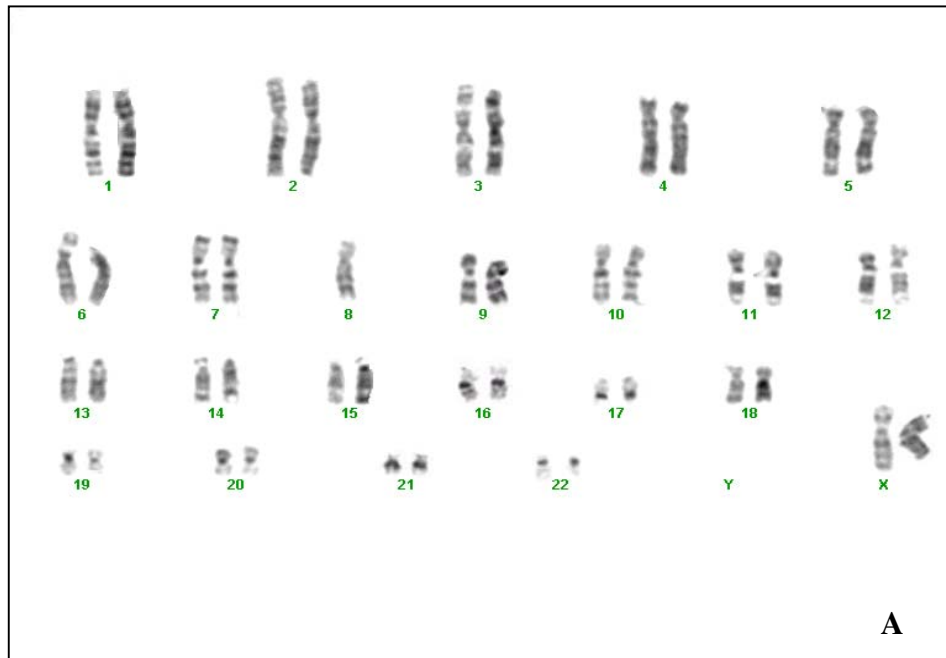


Figura 11 – Caso 4: estudo do tecido cv. A) Cariótipo apresentando monossomia do cromossomo 8; B) Núcleos interfásicos marcados com a sonda D8Z1 mostrando dois sinais do cromossomo 8, não confirmando a monossomia.

5.2.2.2 – Grupo 2: pacientes com cariótipo do tecido cérebro-vascular

Neste grupo (5 casos), estudou-se o cariótipo do tecido CV. Não foi possível o estudo do cariótipo convencional do sangue ou pele devido à inviabilidade de coleta do material uma vez que correspondia aos óbitos neonatais e natimortos.

Todos os casos apresentaram cariótipo normal.

No único caso (14) onde foi possível a análise por FISH interfásico do tecido cv, este não mostrou nenhuma alteração numérica (Tabela 8).

Tabela 7 – Relação dos casos estudados segundo o tipo de defeito e o cariótipo do tecido cérebro-vascular.

Casos	RF	Defeito	Citogenética
14 *	1643	iniencefalia	46,XX
15	1317	anencefalia	46,XX
16	1577	anencefalia	46,XX
17	1603	anencefalia	46,XX
18	1428	EBS	46,XX

* Caso estudado por FISH

Tabela 8 – Resultado da análise do FISH interfásico do tecido cérebro-vascular do caso 14 de acordo com o número de sinais encontrados em cada cromossomo.

RF	BOX (%)														**				X	Y
1643	1	2	3	6	7	8	9	10	11	12	15	16	17*	18	13	14	21	22		
1	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	3	1	-	-	-	-	-	-
2	99	99	100	99	98	98	-	98	100	99	-	98	92	98	-	-	-	-	100	0
3	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	4	-	2	1	1	1	-	-
4	-	-	-	1	1	1	-	2	-	1	-	2	1	1	97	99	98	99	-	-
+															1	-	1	-		

*Marcado em azul: porcentagem de núcleos diplóides fora do IC dos controles;

Marcado em vermelho: porcentagem de núcleos trissômico maior que x+2DP dos controles.

** Todos os autossomos apresentam 2 sinais, com exceção dos cromossomos 13, 14, 21 e 22 que apresentam 4 sinais.

5.2.2.3 – Grupo 3- portadores de dtn com cariótipo de linfócitos

Conforme a Tabela 9, foram analisados 23 casos, sendo que entre esses, 2 apresentaram heteromorfismo, inv(9qh) e 21ps+. Dois outros casos (21 e 31) apresentaram alterações cromossômicas e por isso foram submetidos à análise por FISH interfásico. O resumo clínico dos casos que apresentaram anomalias cromossômicas estão no Anexo 8.

No caso 30, que apresentou heteromorfismo do cromossomo 9, o cariótipo foi analisado por GTG e CBG (Figura 12). O estudo citogenético dos pais evidenciou: cariótipo da mãe: 46,XX e cariótipo do pai: 46,XY,inv(9qh) (Figura 12). No caso 41, que apresentou o outro heteromorfismo, não foi possível o estudo do cariótipo dos pais.

O caso 21, apresentou duas linhagens celulares em linfócitos de punção cardíaca: 46,XX e 47,XY,+21, as quais foram interpretadas como sendo uma quimera. Um número maior de metáfases não foi possível analisar dada à insuficiência de material. O FISH interfásico utilizando as sondas alfa-centroméricas dos cromossomos X (DXZ1) e Y (DYZ1) (*Cytocell*), mostrou a presença de sinal X e Y num mesmo núcleo em 3 (0,2%) núcleos de 1500 contados e utilizando a sonda alfa-centromérica do cromossomo 21 (D21Z1) (*Cytocell*), mostrou a presença de 3 sinais em 3 (0,2%) núcleos de 1500 contados (Tabela 10).

No caso 31, com duas linhagens celulares: 46,XX e 47,XX,+16, observadas no cariótipo convencional, quando estudados por FISH interfásico utilizando a sonda centromérica do cromossomo 16 (D16Z2) (Tabela 10), apresentou ausência de 3 sinais em 300 núcleos analisados, por isso a anomalia observada foi considerada pseudomosaicismo.

Nesse grupo, não foi possível obter suspensão celular do tecido da lesão para análise convencional e/ou FISH porque esses casos fizeram parte do período de padronização da técnica de cultivo desse tecido. No único caso (30) onde foi possível a análise por FISH interfásico do tecido cv, a análise mostrou 3 marcações para a sonda do cromossomo 15 em 8% dos núcleos. No entanto, há dispersão de núcleos, 3% de núcleos com 1 marcação e 3% de núcleos com 4 marcações, parecendo ser mais um artefato do que um mosaicismo verdadeiro (Tabela 11).

Tabela 9 – Relação dos casos estudados que tiveram cariótipo de linfócitos estudados, de acordo com o tipo de defeito.

Caso	RF ¹	Defeito	Citogenética
19	1310	iniencefalia	46,XX
20	1552	iniencefalia	46,XX
21*	1333	anencefalia	46,XX
22	1249	anencefalia	47,XY,+21/46,XX ² (5:30)
23	1348	anencefalia	46,XX
24	1355	anencefalia	46,XX
25	1476	anencefalia	46,XX
26	1474	anencefalia	46,XX
27	1377	craniorraquisquise	46,XX
28	1378	craniorraquisquise	46,XX
29	1441	craniorraquisquise	46,XX
30	1475	craniorraquisquise	46,XX
31 ³ *	1419	EBLS	46,XY,inv(9qh)pat
32	1661	EBLS	46,XX,+16/46,XX ² (2:56)
33	1513	EBTL	46,XY
34	1527	EBT	46,XY
35	1570	EBTS	46,XX
36	1346	encefalocele	46,XX
37	1350	encefalocele	46,XX
38	1373	encefalocele	46,XX
39	1396	encefalocele	46,XX
40	1486	encefalocele	46,XY
41	1594	encefalocele	46,XX,21ps+

¹ RF=Registro Familiar do Programa de Genética Perinatal.

² linfócitos estudados com sondas específicas do FISH interfásico para confirmação da aneuploidia

³ tecido cérebro-vascular estudado por FISH -Multiprobe

Tabela 10 – Resultado da análise do FISH interfásico de linfócitos dos casos 22 e 32 que apresentaram cariótipo alterado por citogenética convencional.

Casos	RF	Cromossomos	Sondas	Marcações			
				2		3	
				Nº	(%)	Nº	(%)
				núcleos		núcleos	
22	1249	X –Y	DXZ1 – XYZ1*	3**	0,2	-	-
		21	D21Z1	-	-	3**	0,2
32	1661	16	D16Z2	300	100,0	0***	0

* As sondas alfa-centroméricas dos cromossomos X e Y foram usadas conjuntamente.

** Foi encontrado 3 núcleos de 1500 núcleos contados com uma marcação do cromossomo X e uma marcação do cromossomo Y e 3 marcações do cromossomo 21

*** Foi encontrado 0 núcleos de 300 núcleos contados com 3 marcações do cromossomo 16

Tabela 11 – Resultado da análise do FISH interfásico do tecido cérebro-vascular do caso 31 de acordo com o número de sinais encontrados em cada cromossomo.

RF 1419	BOX (%)														**				X	Y
	1	2	3	6	7	8	9	10	11	12	15 *	16	17	18	13*	14*	21*	22*		
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	-	3	-	-	-	-	98	97
2	97	98	98	98	99	98	98	99	99	97	86	96	97	92	2	6	-	8	2	3
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	1	5	5	6	8	-	-
4	3	2	2	2	1	2	2	1	1	3	3	2	3	4	93	88	92	83	-	-
+															-	1	2	-		

*Marcado em azul: porcentagem de núcleos diplóides fora do IC dos controles;

Marcado em vermelho: porcentagem de núcleos monossômico e trissômico maior que x+2DP dos controles.

** Todos os autossomos apresentam 2 sinais, com exceção dos cromossomos 13, 14, 21 e 22 que apresentam 4 sinais.

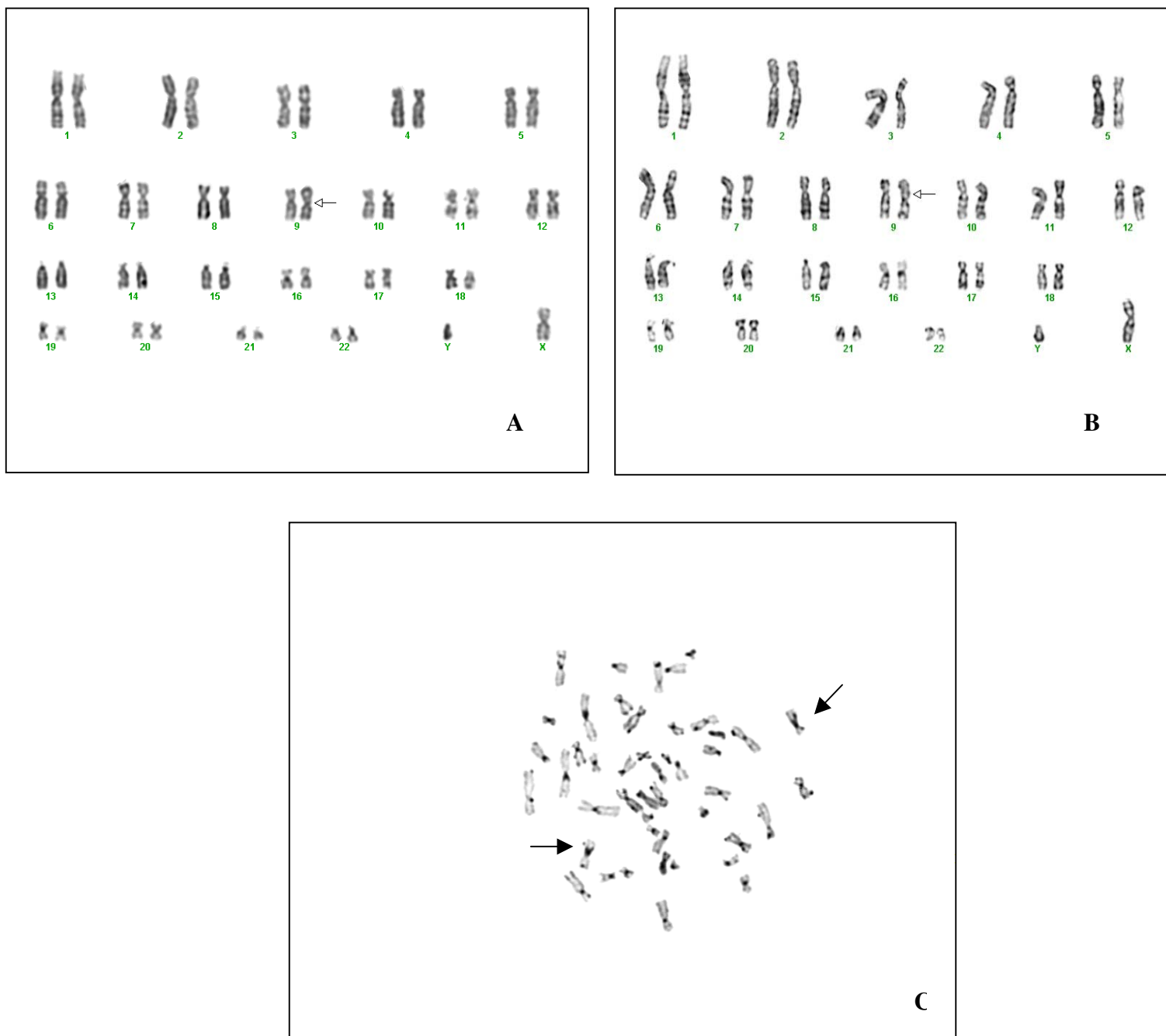


Figura 12 – Caso 31: A) Cariótipo do propósito: 46,XY,inv(9qh); B) Cariótipo do pai do propósito: 46,XY,inv(9qh); C) Cariótipo do propósito com bandamento CBG, indicando o cromossomo 9.

6- DISCUSSÃO

No presente estudo, a anencefalia foi o tipo de DTN mais freqüente, seguida por espinha bífida e encefalocele. Entre os DTN, cerca da metade dos casos corresponderam as anencefalias e outra metade às espinhas bífidas. O predomínio de recém-nascido do sexo feminino, principalmente nas anencefalias, também tem sido referido por vários autores (CALVO e MARTINEZ-FRIAS, 2002; PEI et al., 2003; RAMIREZ-ESPITIA et al., 2003).

A freqüência de anomalias cromossômicas neste estudo foi de 6% (2/36). Dos 36 casos que foram analisados o cariótipo constitucional, 2 apresentaram anomalias cromossômicas: um caso de mosaicismo 4N/2N e um caso de quimerismo.

O objetivo principal do trabalho foi pesquisar alterações numéricas e mosaicismo no tecido cérebro-vascular baseado na hipótese de anomalia cromossômica numérica restrita aos tecidos envolvidos na lesão. Podemos observar, no presente estudo, uma maior porcentagem de alteração cromossômica restrita ao tecido CV, confirmando essa hipótese. Baseado nos dados das Tabelas 5 e 6, 8% foi a porcentagem de anomalia cromossômica quando se estuda a citogenética convencional em tecido sangüíneo e pele, 15% e 25% quando se estuda a citogenética convencional e FISH, respectivamente, do tecido da lesão.

As porcentagens de aneuploidia encontradas no tecido cérebro-vascular (25%) são próximas do que foram encontrados em tecido nervosos em modelos animais (33%) quando estudadas por FISH (REHEN et al., 2001). Também foi observada baixa taxa de aneuploidia em linfócitos, que é consistente com relatos da literatura realizados em material de humano e de ratos (NEURATH et al., 1970; GUTTENBACH et al., 1995), e significativamente diferente do que observado em neuroblastos de ratos (REHEN et al., 2001).

A porcentagem de anomalias cromossômicas detectadas pela citogenética molecular (FISH) foi maior do que as observadas através da técnica de citogenética convencional. Pode-se deduzir que a freqüência de alterações cromossômicas poderia ter sido mais alta, quando estudadas por FISH, se considerarmos que a avaliação foi prejudicada devido a impossibilidades de se estudar todos os cromossomos.

Vários estudos vêm comparando o resultado do cariótipo convencional e análise por FISH para detectar aneuploidias (BRYNDORF et al., 1997; MUKHERJEE e THOMAS, 1997; JALAL et al., 1998; RUANGVUTILERT et al., 2000). A utilização de sondas centroméricas para o estudo de aneuploidias em mosaico tem se mostrado uma técnica mais sensível, por identificar a presença de linhagens cromossomicamente aneuplóides, em estudos de casos de quadros dismórficos, nos quais citogenética convencional não detectou a linhagem trissômica (JALAL et al., 1998; JOHNSON *et al*, 2000).

No presente estudo, foi detectado 1 caso apresentando mosaicismo do cromossomo 6 restrito ao tecido cv, apenas quando estudado por FISH, 2 casos de mosaicismo 4N/2N restrito ao tecido cv, analisado por citogenética convencional e confirmado por FISH, e um caso de pseudomosaicismo do cromossomo 8 encontrado pela citogenética convencional e não confirmado por FISH. Curiosamente, encontrou-se 2 casos (um deles duvidoso) de monossomia associados a anencefalia e 2 casos de mosaicismo 4N/2N em casos de espinha bífida. Entretanto, a amostra é muito pequena para supor uma associação de anomalia cromossômica com o tipo específico de defeito.

A associação de DTN e anomalias cromossômicas é bem conhecida (SELLER, 1995; PHILLIP et al., 2002). Com relação aos DTN, anomalias cromossômicas são relatadas principalmente quando associadas a outras malformações do que defeitos isolados (SINGER et al., 1987; NEWTON et al., 1994; KENNEDY et al. 1998). Este estudo mostrou uma associação de anomalia cromossômica maior em crianças com DTN isolado do que DTN associado com outras malformações. Os dois casos de espinha bífida que tiveram cariótipo apresentando heteromorfismo dos cromossomos 9 e 21, apresentaram DTN associado com outras malformações como prega palmar única e hérnia diafragmática, respectivamente. O caso de quimerismo também apresentou associações com outras malformações (LUCON et al., 2004) e o caso de monossomia do 6 com cisto de Dandy-Walker. Os demais casos que apresentaram anomalia cromossômica eram portadores de DTN isolados.

Os resultados deste estudo, sugerem que anomalias numéricas podem ser comuns em tecidos envolvidos no defeito do tubo neural. Entretanto, estes resultados sugerem que estudos futuros com tecido neural em humanos sejam fundamentais para esclarecer a relação entre anomalia cromossômica e tecido nervoso.

- **CRIPTOMOSAICISMO DO CROMOSSOMO 6 NO TECIDO CV:**

Anomalias cromossômicas numéricas podem passar despercebidas quando em estado de mosaico, pela citogenética convencional. Dessa forma, mosaicismos cromossômicos crípticos poderiam ser mais facilmente identificados com a utilização de FISH interfásico. JOHNSON et al. (2000) relataram algumas alterações cromossômicas detectadas apenas quando se utiliza FISH em núcleo interfásico, sugerindo que o uso deste, permite a identificação de mosaicismo que as técnicas convencionais podem não identificar.

A detecção de mosaicismo é basicamente determinada por quatro fatores: o tipo e o número de tecidos estudados (HOOK, 1977), a sensibilidade da técnica utilizada e a possibilidade de seleção celular negativa da linhagem alterada, durante o cultivo celular, que pode resultar em uma estimativa inferior da porcentagem da linhagem trissômica realmente presente, podendo em alguns casos extremos, inviabilizar a detecção do mosaicismo (PROCTER *et al*, 1984; HELD *et al*, 1992). LOMAX *et al*. (1994) estudaram a sensibilidade e a eficiência do FISH interfásico para a detecção de mosaicismos cromossômicos, em núcleos interfásicos de tecidos cultivados e não cultivados. Segundo esses autores, o nível mais baixo de monossomia e de trissomia que podem ser detectados por cada sonda, seria estabelecida pela menor proporção de detecção desses resultados em tecidos controles, conhecidamente diplóides.

O FISH interfásico detectou no tecido cérebro-vascular, proporções maiores de células aneuplóides (62%) do que diplóides do cromossomo 6 e que não foram detectadas pela citogenética convencional. JOBANPUTRA et al. (2002), detectou uma anormalidade maior pela técnica de FISH do que pela citogenética convencional ao estudarem abortos espontâneos. MUKHERJEE e THOMAS (1997) relataram altas porcentagens de células aneuplóides detectadas por FISH do que em metáfases, dos 17 cromossomos estudados em

pacientes com idade avançada, os cromossomos 1, 4, 6, 8, 10 e 15 mostraram frequências altas de aneuploidia, em núcleos interfásicos, do que o restante dos 11 cromossomos estudados.

McFADDEN et al. (1989), relataram associação de um feto, abortado espontaneamente, portador de encefalocele com monossomia do 6. No caso do presente estudo, a anencefalia está associada a outra malformação, como cisto de Dandy-Walker que vem sendo associado a outras anormalidades cromossômicas, como principalmente trissomia do cromossomo 9 (GOLDEN e SCHOENE, 1993; VON KAISENBERG et al., 2000), como também anormalidade do cromossomo 13 (McCORMACK et al., 2003), mas nenhum relato com anormalidades do cromossomo 6.

A presença de aneuploidia cromossômica em células, como neurônio e glia, de ratos normais foi recentemente relatada por outros autores (KAUSHAL et al., 2003; YANG et al., 2003). REHEN et al. (2001) estudaram neuroblastos de ratos por FISH e observaram uma porcentagem maior de perdas cromossômicas (1,6-8,8%) do que ganhos cromossômicos (menor que 2%) das células analisadas. KAUSHAL et al. (2003), também ao estudarem ratos, observaram que 33% das células da zona subventricular *in vivo*, uma área que abriga grande número de células neurais que darão origem a neurônios e glia, são aneuplóides, sendo 25% desses, correspondentes a perda cromossômica. Estes autores, ao estudarem FISH dos cromossomos X e Y, observaram que a porcentagem de aneuploidia encontrada nas células da zona ventricular *in vivo* e *in vitro* é semelhantes (~7%). No presente estudo, não foi observado perdas e ganhos dos cromossomos X e Y, como observado nos trabalhos em modelos animais (REHEN et al., 2001; KAUSHAL et al., 2003).

- **MOSAICISMO 4N/2N NO TECIDO CV:**

A tetraploidia pode ser encontrada como um artefato da técnica de cultivo celular em culturas de fibroblastos submetidas a um grande número de repicagens (KOHN e ROBINSON, 1970; SPERLINGER e SALING, 1971; ANNEREN, 1982). Entretanto, a detecção de células tetraplóides associada ao quadro de malformações tem sido considerada um achado de valor diagnóstico (EDWARDS et al., 1994).

Os casos estudados pela técnica de FISH em núcleo interfásico confirmaram o exame diagnóstico, anteriormente realizado, por citogenética convencional, mostrando que o diagnóstico não foi devido a um artefato na cultura.

A proporção de células tetraplóides pode apresentar grandes variações entre os pacientes. Este fato pode ocorrer devido à especificidade do mosaicismo presente em cada tecido investigado. A ocorrência de células tetraplóides detectadas apenas em tecido cérebro-vascular e não em linfócitos de sangue periférico pode sugerir a existência de uma desvantagem à proliferação de células tetraplóides, fazendo com que exista uma seleção negativa em relação às essas células. Assim, a menor proporção de células tetraplóides observadas nessas análises, pode estar relacionada a uma seleção *in vitro*, favorável à linhagem celular diplóide (NIELSEN e KRAG-OLSEN, 1980). Existem ao menos dois mecanismos possíveis para o surgimento do mosaicismo tetraplóide-diplóide: a primeiro seria a de uma falha da citocinese, em estágio inicial do desenvolvimento embrionário, resultando em um embrião mosaico. Entretanto, a presença de células com um conteúdo cromossômico tetraplóide, pode ser clinicamente significativo, se observada em altas proporções e associada a quadros clínicos de malformações. A outra possibilidade seria a fusão de dois embriões, um 2N e outro 4N, os quais dariam origem a uma quimera 4N-2N (EDWARD et al, 1994).

No caso 10, além do cariótipo 4N/2N, também apenas observado por FISH interfásico, foi detectada proporção maior de células aneuplóides (5 sinais) do que diplóides (4 sinais esperados) nas sondas 13/21 e que não foram detectadas pela citogenética convencional, sugerindo uma trissomia do cromossomo 13 ou 21. Os cariótipos hipertetraplóides já foram encontrados em abortos espontâneos e, em ambos os casos relatados, os cromossomos extras eram o 16 (BOUÉ e BOUÉ, 1994; KAJII et al., 1980), e tem sido explicado como sendo decorrentes de uma falha na clivagem da primeira divisão de um zigoto com trissomia 16 (BOUÉ e BOUÉ, 1970).

KAUSHAL et al. (2003), sugerem que as taxas de mosaicismo cromossômico são altas no sistema nervoso central do que em outros tecidos. Como o mosaicismo 4N/2N encontrado está restrito ao tecido cérebro-vascular, sugerimos que possa haver um erro na divisão mitótica das células desse tecido, resultando em aneuploidia. A presença de

aneuploidia cromossômica em tecido nervoso normal de ratos vem sendo recentemente relatada na literatura (REHEN et al., 2001; YANG et al., 2003), sendo o resultado provável de não-disjunção mitótica (CERVANTES et al., 2002) e durante o desenvolvimento pós-zigótico humano (KALOUSEK, 2000). Embora a função precisa da aneuploidia em células neurais ainda não é conhecida, os efeitos da aneuploidia podem modular expressão de gene, proliferação e sobrevivência das células (KAUSHAL et al., 2003).

- **CASOS ESTUDADOS POR FISH QUE APRESENTAM RESULTADO FORA DO IC DOS CONTROLES:**

A detecção de mosaicismo, especialmente de baixa frequência, por FISH, nesse estudo, gerou dúvidas. Teoricamente, seria considerado mosaicismo todo caso que apresentasse 1 ou 3 marcações em valores fora do limite inferior encontrado, entretanto, consideramos mosaicismo verdadeiro, os casos que apresentaram porcentagens de núcleos monossômicos ou trissômicos maior do que 10%.

ANASTASI *et al.* (1990) propuseram um método para o estabelecimento do nível de mosaicismo cromossômico que pode ser detectado pela técnica de FISH interfásico, em um determinado tecido. Esses autores sugerem que a monossomia ou a trissomia possa ser diagnosticada em casos que apresentem uma porcentagem de núcleos com um ou três sinais de hibridização, excedendo em duas vezes desvio padrão ($x+2DP$) encontrado na análise de uma amostra controle, a partir das porcentagens de células apresentando um único sinal (falso monossômico) ou três sinais (falso trissômico). Os casos com porcentagem dos núcleos diplóides fora dos IC dos controles mostram distribuições semelhantes entre os sinais monossômicos e trissômicos, e mesmo que essas porcentagens sejam maior da $x+2DP$, é duvidoso afirmar que esses casos apresentam alterações cromossômicas verdadeiras no tecido CV, apresentando monossomia ou trissomia sendo mais provável que seja artefato de técnica devido a inespecificidade de hibridização dos sinais no tecido CV, principalmente para os quadrantes 13/21 e 14/22. Os demais casos que mostram número de marcações baixas (2%, 3%) sem dispersão, também foram considerados duvidosos para ser mosaico verdadeiro.

Os quadrantes das sondas 13/21 e 14/22 mesmo apresentando maiores porcentagens de células trissômicas, foram considerados como pseudo-mosaicismo, porque essas porcentagens são mostradas em praticamente todos os casos (vide Tabela 5) e a marcação de 3 sinais pode ter sido resultado da eficiência da hibridização dos sinais devido a essas sondas apresentarem marcações cruzadas entre dois cromossomos.

O caso 10 apresentou 1 e 3 sinais do cromossomo 18 (vide tabela 5) com uma porcentagem maior do que $x+2DP$ (3.9 e 3.7%, respectivamente), mas não consideramos mosaicismo devido à distribuição dessas porcentagens com 1 e 3 sinais serem semelhantes. Assim como também acontece com o caso 18, que apresenta distribuição de 1 e 3 sinais no cromossomo 17 (Tabela 5).

Para ter certeza de anormalidade cromossômica verdadeira, é preciso estudar as aneuploidias relacionadas e verificar a porcentagem de hibridização dos sinais encontrada em tecido nervoso normal.

• Inv (9qh) em LINFÓCITOS e SUPOSTA TRISSOMIA DO CROMOSSOMO 15 EM MOSAICO NO TECIDO CV:

Relatamos nesse estudo, um caso de espinha bífida portador da inversão da heterocromatina do cromossomo 9. Alguns citogeneticistas, não associam a inversão 9(qh) com nenhuma consequência fenotípica (RAMESH et al., 1996). Porém, vários autores relataram um elo entre inv9(qh) com infertilidade, abortos recorrentes, várias outras condições clínicas anormais e anormalidades cromossômicas que surgem como resultado desta inversão (FRYNS, 1985; MURTHY e PRABHAKARA, 1990; SERRA et al., 1990; YAMADA, 1992; TEO et al., 1995; INAYAMA et al., 1997; SASAGAWA et al., 1998; BALTAÇI et al., 1999; DAVALOS et al., 2000; PARMAR E SIRA, 2003). SALIHU et al. (2001), relataram um caso de encefalocele portador dessa inversão.

Especula-se que inv9(qh) pode ter algum efeito intercromossomo conduzindo uma incidência maior de erro na divisão mitótica das células, assim como também acontece com as células nervosas, resultando em aneuploidia, podendo assim explicar o achado da suposta trissomia do cromossomo 15 em mosaico restrito ao tecido CV analisado por FISH.

A porcentagem de células diplóides desse caso foi fora (12,7%) do IC das células diplóides dos controles, mostrando uma maior concentração de células trissômicas, 8% maior do que $x+2DP$ das marcações trissômicas da amostra controle, entretanto, não podemos afirmar que se trata de um caso de mosaicismo verdadeiro devido a distribuição entre os sinais (1, 3 e 4 sinais).

- **MOSAICISMO 4N/2N EM PELE:**

O caso estudado pela técnica de FISH em núcleo interfásico confirmou o exame diagnóstico, anteriormente realizado, por citogenética convencional, mostrando que o diagnóstico não foi devido a um artefato na cultura.

A proporção de núcleos tetraplóides encontrados por FISH, foi também menor nesse caso (6), do que a previamente descrita pelo estudo citogenético convencional. Uma possível causa desta diferença, seria a utilização de fibroblastos já submetidos previamente a 11 repicagens. Em cultura de fibroblasto de humanos, altas porcentagens de aneuploidia em células jovens podem ser detectadas na interfase do que na metáfase. Isto presumivelmente indica que durante a divisão ativa de células jovens, mais células aneuplóides do que diplóides são selecionadas para não entrar em mitose. Em contraste, células de senescência mostram significativamente poucos núcleos aneuplóides na interfase do que células jovens, porque durante a senescência existe grande pressão seletiva na cultura contra a sobrevivência de células aneuplóides do que a sobrevivência de células diplóides (MUKHERJEE et al. 1995).

- **PSEUDOMOSAICISMO EM TECIDO CV E EM LINFÓCITOS:**

- Tecido CV

O caso que apresentou baixa porcentagem (6%) de mosaicismo da linhagem monossômica do cromossomo 8, pode ser atribuído a um efeito de seleção negativa da linhagem alterada, como sugerido por FORD (1967) ou pode ser resultado de artefato de crescimento celular *in vitro*, embora REHEN et al. (2001) ao estudarem neuroblastos de ratos por FISH, observaram também monossomia do cromossomo 8. Para diagnóstico conclusivo, de baixo mosaicismo no tecido cv, foi realizado a análise por FISH e o mosaicismo foi descartado.

➤ Linfócitos

No presente estudo, nós relatamos um caso de espinha bífida sem outras malformações apresentando cariótipo com baixa porcentagem de mosaicismo das linhagens trissômicas do cromossomo 16 (4%). McFADDEN et al. (1989), já havia relatado associação de um feto, abortado espontaneamente, portador de espinha bífida com trissomia do 16. Para diagnóstico conclusivo, de baixo mosaicismo, foi realizado a análise por FISH (D16Z2) e o mosaicismo foi descartado. Foi inviável aumentar o número de células analisadas e, portanto preferimos considerar este caso como pseudomosaicismo.

• QUIMERISMO

Anencefalia associada a trissomia do 21 foi relatada por SCHINZEL (1983). O fenótipo do recém-nascido aqui apresentado não evidencia sinais compatíveis com a síndrome de Down. Isso talvez possa ser explicado pela baixa frequência da linhagem trissômica. Por outro lado, o único tecido estudado foi o sangue. Quimerismo é uma rara condição, geralmente identificada quando se observa duas linhagens celulares com complementos cromossômicos sexuais discordantes derivados de dois ou mais zigotos (SAWAI et al., 1994; FORD, 1969). Teoricamente, o mecanismo da formação de quimera pode ser: (1) fusão de diferentes zigotos, (2) dupla fertilização de um óvulo e um corpúsculo polar por dois diferentes espermatozóides e subsequente fusão de zigotos, (3) fertilização de um óvulo haplóide ou um corpúsculo polar e subsequente fusão com um corpúsculo polar ou óvulo diplóide, e (4) fusão de um espermatozóide diplóide com um zigoto diplóide (SAWAI et al., 1994). O mecanismo da formação de quimera neste propósito pode ser resultado da fusão de dois diferentes zigotos, um com o cariótipo normal 46,XX e outro com cariótipo trissômico 47,XY,+21 (LUCON et al., 2004).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foi possível observar uma maior porcentagem de aneuploidias restritas ao tecido cérebro-vascular do que linfócitos.
- A porcentagem de aneuploidia encontrada no tecido cérebro-vascular foi semelhante à porcentagem encontrada nos trabalhos experimentais em roedores.
- A análise por FISH permitiu detectar uma porcentagem maior de anormalidades cromossômicas do que pela citogenética convencional.
- Os DTNs isolados apresentaram uma maior porcentagem de aneuploidias do que os DTNs associados a outras malformações.
- As aneuploidias encontradas no tecido cérebro-vascular pela citogenética convencional e FISH parecem estar associadas aos tecidos envolvidos na lesão de pacientes portadores de DTN. Para entender melhor essa possível associação, haveria necessidade de se estudar também tecido nervoso aparentemente normal, sem malformações, de indivíduos da espécie humana.

7- CONCLUSÃO

- 1) A frequência de anomalias cromossômicas em portadores de DTN na presente amostra foi de 6%.
- 2) Confirmamos a nossa hipótese de que há uma maior porcentagem de alteração cromossômica restrita ao tecido CV do que em linfócitos.
- 3) Anomalias cromossômicas restritas ao tecido cérebro-vascular de portadores de DTN foram observadas no presente estudo com uma frequência de 25% quando o estudo foi realizado por FISH interfásico.
- 4) O FISH interfásico mostrou a presença de criptomosaicismo em pelo menos um caso (monossomia do cromossomo 6 em mosaico).
- 5) As anomalias cromossômicas observadas nos tecido cérebro-vascular de portadores de DTN foram: monossomia do cromossomo 6 em mosaico e mosaicismo 4N/2N.
- 6) Para os casos de mosaicismos restritos ao tecido cérebro-vascular, sugerimos que possa haver um erro na divisão mitótica das células desse tecido, resultando em aneuploidia.
- 7) O significado da associação de anomalia cromossômica restrita ao tecido cérebro-vascular em portadores de DTN, não está claro, necessitando de pesquisas complementares.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-GAZALI, L. I. ; PADMANABHAN, R. ; MELNYK, S. ; YI, P. ; POGRIBNY, I. P.; POGRIBNA, M. ; BAKIR, M. ; HAMID, Z. A. ; ABDULRAZZAQ, Y. ; DAWODU, A. ; JAMES, S. J. – Abnormal folate metabolism and genetic polymorphism of the folate pathway in a child with Down syndrome and neural tube defect. **Am J Med Genet**, 103(2):128-32, 2001.

ANASTASI, J.; LE BEAU, M. M.; VARDIMAN, J. W.; WESTBROOK, C. A. Detection of numerical chromosomal abnormalities in neoplastic hematopoietic cells by in situ hybridization with a chromosome-specific probe. **Am J Pathol**, 136(1):131-9, 1990. ANNEREN, G. Increased frequency of tetraploidy in cultured skin fibroblasts from extremities with reduction malformations. **Hereditas**, 96:255-9, 1982.

BABCOOK, C. J. ; BALL, R. H. ; FELDKAMP, M. L. Prevalence of aneuploidy and additional anatomic abnormalities in fetuses with open spina bifida: population based study in Utah. **J Ultrasound Med**, 19(9):619-23, 2000.

BALTACI, V.; ORS, R.; KAYA, M.; BALCI, S. A case associated with Walker Warburg syndrome phenotype and homozygous pericentric inversion 9: coincidental finding or aetiological factor? **Acta Paediatr**, 88(5):579-83, 1999.

BECERRA, J. E.; KHOURY, M. J.; CORDERO, J. F.; ERICKSON, J. D. Diabetes mellitus during pregnancy and the risks for specific birth defects: a population-based case-control study. **Pediatrics**, 85(1):1-9, 1990.

BENN, A. ; Warburton, D. ; Byrne, J. M. ; RUDELLI, R. ; SHONNHOUT, A. ; YEBOA, K. ; MOOTABAR, H. ; HSU, L. Y. A Fetus with a chromosome 13 ring and placenta with chromosome 13 rod/ring mosaicism. **Prenat Diagn**, 3(4): 297-302, 1983.

BOTTO, L. D. ; MOORE, C. A. ; KHOURY, M. J. ; ERICKSON, J. D. Neural-tube defects. **N Eng J Med**, 341: 1509-19, 1999.

BOTTO, L. D. ; OLNEY, R. S. ; ERICKSON, J. D. Vitamin supplements and the risk for congenital anomalies other than neural tube defects. **Am J Med Genet**, 125C(1): 12-21, 2004.

BOUÉ, A.; BOUÉ, J. Chromosome abnormalities and abortion. **Basic Life Sci**, 4 (PT.B): 317-339, 1974.

BRUNONI, D. **Alto risco genético. Aspectos neonatais. Pediatría Moderna**. XXI(8): 415-447, 1986.

BRYNDORF, T.; CHRISTENSEN, B.; VAD, M.; PARNER, J.; BROCKS, V.; PHILIP, J. Prenatal detection of chromosome aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: experience with 2000 uncultured amniotic fluid samples in a prospective preclinical trial. **Prenat Diagn**, 17(4):333-41, 1997.

BYRNE, J. ; WARBURTON, D. Neural tube defects in spontaneous abortions. **Am J Med Genet**, 25(2):327-33, 1986.

CALVO, A. S.; MARTÍNEZ-FRIAS, M. A. Comparación de las características epidemiológicas de los defectos del tubo neural clasificados según el fallo de los distintos puntos de cierre. **An Esp Pediatr**, 57(5):457-65, 2002.

CARRIERE, C. **Etude clinique et cytogénétique d'une enfant trisomique pour le segment p23.3→pter du chromosome 2**. Lyon, 1975. (Thèse).

CASTILLA, E. E.; ORIOLI, I. M. Epidemiology of the neural tube defects in South America. **Am J Med Genet**, 22: 695-702, 1985.

CAVALCANTI, D. P. Epidemiologia dos defeitos de fechamento do tubo neural. Mesa redonda 6: Genes, homocisteína, nutrição e os defeitos de fechamento de tubo neural. **Genet Mol Biol**, 23 (Supl.): XIII-XIV, 2000.

CERVANTES, R. B.; STRINGER, J. R.; SHAO, C.; TISCHFIELD, J. A.; STAMBROOK, P. J. Embryonic stem cells and somatic cells differ in mutation frequency and type. **Proc Natl Acad Sci** , 99:3586–3590, 2002.

CHEN, C. P. ; CHERN, S. R. ; LEE, C. C. ; CHEN, W. L. ; WANG, W. Prenatal dianosis of mosaic ring chromosome 13 with anencephaly. **Prenat Diagn**, 21(2): 102-5, 2001.

COERDT, W. ; MILLER, K. ; HOLZGREVE, W. ; RAUSKOLB, R. ; ASHWINGER, E. ; REHDER, H. Neural tube defects in chromosomally normal and abnormal human embryos. **Ultrasound Obstet. Gynecol**, 10(6):410-5, 1997.

CORTES, F.; MELLADO, C.; HERTRAMPF, E.; ALLIENDE, E.; CASTILLO, S. Frequency of neural tube defects in public maternity during 1999 in Santiago, Chile. *Rev Med Chil*, 129(3):277-84, 2001.

CRAING, J. C. ; BENNETT, G. D. ; MIRANDA, R. C. ; MACKLER, S. A. ; FINNELL, R. H. Ribonucleotide reductase subunit R1: a gene conferring sensitivity to valproic acid-induced neural tube defects in mice. **Teratology**, 61(4):305-13, 2000.

DAVALOS, I. P.; RIVAS, F.; RAMOS, A. L.; GALAVIZ, C.; SANDOVAL, L.; RIVERA, H. inv(9)(p24q13) in three sterile brothers. **Ann Genet**, 43(1):51-4, 2000.

DESESSO, J. M.; SCIALLI, A. R.; HOLSON, J. F. Apparent lability of neural tube closure in laboratory animals and humans. **Am J Med Genet**, 19;87(2):143-62, 1999.

De WAL, P.; RUSEN, I. D.; LEE, N. S.; MORIN, P.; NIYONSENGA, T. Trend in prevalence of neural tube defects in Quebec. **Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol**, 67(11):919-23, 2003.

DIAMANTE, A.; CYPEL, S. Malformações cerebrais. IN: DIAMANTE, A.; CYPEL, S. **Neurologia infantil**. 3° ed., São Paulo: Atheneu, 1996. P745.

DORAY, B. ; FAVRE, R. ; GASSER, B. ; GIRARD-LEMAIRE, F. ; SCHLUTH, C. ; FLORI, E. Recurrent Neural Tube Defects Associated with Partial Trisomy 2p22-pter: report of two siblings and review of the literature. **Genet Couns**, 14(2): 165-72, 2003.

DRUGAN, A.; JOHNSON, M. P.; DVORIN, E.; MOODY, J.; KRIVCHENIA, E. L.; SCHAWARTZ, D.; EVANS, M. I. Aneuploidy with neural tube defects: another reason for complete evaluation in patients with suspected ultrasound anomalies or elevated maternal serum alpha-fetoprotein. **Fetal Ther**, 4 (2-3): 88-92, 1989.

EDWARDS MJ, PARK JP, WURSTER-HILL DH, GRAHAM JM JR. Mixoploidy in humans: two surviving cases of diploid-tetraploid mixoploidy and comparison with diploid-triploid mixoploidy. **Am J Med Genet**, 52(3):324-30, 1994.

ESKES, T. K. A. B. Folates and the fetus. **Eur J Obst Gynec Repr Biol**, 71: 105-111, 1997.

EVANS, M. I.; LLURBA, E.; LANDSBERGER, E. J.; OBRIEN, J. E.; HARRISON, H. H. Impact of folic Acid fortification in the United States: markedly diminished high maternal serum alpha-fetoprotein values. **Obstet Gynecol**, 103(3):474-9, 2004.

FINNELL, R. H.; GOULD, A.; SPIEGELSTEIN, O. Pathobiology and genetics of neural tube defects. **Epilepsia**, 44 Suppl 3:14-23, 2003.

FITZGERALD, M. J. T. **Embriologia humana**. São Paulo: Harper & Row do Brasil, 1980, 197 p.

FLANARY, B. E. ; STREIT, W. J. Progressive telomere shortening occurs in cultured rat microglia, but not astrocytes. **Glia**, 45(1):75-88, 2004.

FORD, C. E. Mosaics and chimaeras. **Br Med Bull**, 25:104-9, 1969.

FREY, L. ; HAUSER, W. A. Epidemiology of neural tube defects. **Epilepsia**, 44 Suppl 3: 4-13, 2003.

FROSST, P.; BLOM, H. J.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, C. A.; MATTHEWS, R. G.; BOERS, G. J. H.; DER HEIJER, M.; KLUIJTMANS, L. A. J.; VAN DER HEUVEL, L. P.; ROZEN, R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics**, 10: 111-113, 1995.

FRYNS, J. P.; KLECZKOWSKA, A.; LONDERS, L.; Van den BERGHE, H. Unusual chromosome 9 polymorphism and reproductive failure. **Ann Genet**, 28(1):49-51, 1985.

GOYETTE, P.; SUMNER, J. S.; MILOS, R.; DUNCAS, A. M.; ROSENBLATT, D. S.; MATTHEWS, R. G.; ROZEN, R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification. **Nat Genet**, 7(4):551, 1994.

GOLDEN, J. A.; SCHÖNE, W. C. Central nervous system malformations in trisomy 9. **J Neuropathol Exp Neurol**, 52(1):71-7, 1993.

GRAHAM, J. M. JR.; EDWARDS, M. J.; EDWARDS, M. J. Teratogen update: gestational effects of maternal hyperthermia due to febrile illnesses and resultant patterns of defects in humans. **Teratology**, 58(5):209-21, 1998.

GUEANT, J. L.; GUEANT-RODRIGUEZ, R. M.; ANELLO, G.; BOSCO, P.; BRUNAUD, L.; ROMANO, C.; FERRI, R.; ROMANO, A.; CANDITO, M.; NAMOUR, B. Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defects and Down syndrome? **Clin Chem Lab Med**, 41(11):1473-7, 2003.

GUTTENBACH, M.; KOSCHORZ, B.; BERNTHALER, U.; GRIMM, T.; SCHMID, M. Sex chromosome loss and aging: in situ hybridization studies on human interphase nuclei. **Am J Hum Genet**, 57(5):1143-50, 1995

HAHM, G. K. ; BARTH, R. F. ; SCHAUER, G. M. ; REISS, R. ; OPITZ, J. M. Trisomy 2p syndrome: a fetus with anencephaly and postaxial polydactyly. **Am J Med Genet**, 87(1): 45-8, 1999.

HALL, J. G.; FRIEDMAN, J. M.; KENNA, B. A. - Clinical, genetic, and epidemiological factors in neural tube defects. **Am J Hum Genet**, 43:827-37, 1988.

HAUPT, R. ; BYRNE, J. ; DEFFERRARI, R. ; CAMA, A. ; LEVATO, L. ; LAVIA, N.; VIGLIAROLO, M. A. ; CAPRA, V. ; ANDREUSSI, L. Cytogenetics of the tissue involved in neural tube defects. **Genet Couns** , 6(1): 49-53, 1995.

HELD KR, KERBER S, KAMINSKY E, SINGH S, GOETZ P, SEEMANOVA E, GOEDDEHW. Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? **Hum Genet**, 88(3):288-94, 1992.

HERRERA, E. ; SAMPER, E. ; BLASCO, M. A. Telomere shortening in mTR-/- embryos is associated with failure to close the neural tube. **EMBO Journal**, 18(5): 1172-81, 1999.

HIBBARD, E. D.; SMITHLESS, R. W. Folic acid metabolism and human embryopathy. **Lancet**, i: 1254, 1965.

HUME, R. F. Jr.; DRUGAN, A. ; REICHLER, A. ; LAMPINEN, J. ; MARTIN, L.S. ; JOHNSON, M.P. ; EVANS, M.I. Aneuploidy among prenatally detected neural tube defects. **Am J Med Genet** , 61(2): 171-3, 1996.

HUNTER, A. G.H. Brain and spinal cord. IN: STEVENSON, R.E.; HALL, J.G.; GOODMAN, R.M. eds. **Human malformations and related anomalies**. New York, Oxford, 1993. p. 109-37.

HOOK EB. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. **Am J Hum Genet**, 29(1):94-7, 1977.

ICBDMS. **A report from the international clearinghouse for birth defects monitoring systems**. Amsterdam. Elsevier , 1991, 220p.

INAYAMA, Y.; YONEDA, H.; FUKUSHIMA, K.; SAKAI, J.; ASABA, H.; SAKAI, T. Paracentric inversion of chromosome 9 with schizoaffective disorder. **Clin Genet**, 51(1): 69-70, 1997.

JALAL, S. M. ; LAW, M. E. ; CARLSON, R. O. , et al. Prenatal detection of aneuploidy by directly labeled multicolored probes and interphase fluorescence in situ hybridization. **Mayo Clin Proc** , 73:132-7, 1998.

JOBANPUTRA, V. ; SOBRINO, A. ; KINNEY, A. ; KLINE, J. ; WARBURTON, D. Multiplex interphase FISH as a screen for common aneuploidies in spontaneous abortions. **Hum Reprod**, 17(5): 1166-70, 2002.

JOHNSON, P. ; DUNCAN, K. ; BLUNT, S. ; BELL, G. ; ALI, Z. ; COX, P. ; MOORE, G.E. Apparent confined placental mosaicism of trisomy 16 and multiple fetal anomalies: case report. **Prenatal Diagnosis**, 20(5): 417-21, 2000.

JURILLOF, D. M.; HARRIS, M. J.; TOM, C.; MACDONALD, K.B. Normal mouse strains differ in the site of initiation of closure of the cranial neural tube. **Teratology**, 44(2): 225-33,1991.

KAJII, T.; FERRIER, A.; NIIKAWA, N.; TAKAHARA, H.; OHAMA, K., AVIRACHAN, S. Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses. **Human Genet**, 55(1): 87-98, 1980.

KALOUSEK, D. K. Pathogenesis of chromosomal mosaicism and its effect on early human development. **Am J Med Genet**, 91:39-45, 2000.

KAUSHAL, D. ; CONTOS, J. J. ; TREUNER, K. ; YANG, A. H. ; KINGSBURY, M. A. ; REHEN, S. K. ; McCONNELL, M. J. ; OKABE, M. ; BARLOW, C. ; CHUN J. Alteration of gene expression by chromosome loss in the postnatal mouse brain. **J Neurosci**, 23(13): 5599-606, 2003.

KENNEDY, D. ; CHITAYAT, D. ; WINSOR, E. J. ; SILVER, M. ; TOI, A. Prenatally diagnosed neural tube defects: ultrasound, chromosome, and autopsy or postnatal findings in 212 cases. **Am J Med Genet**, 77(4): 317-21, 1998.

KHOURY, M. J. ; ERICKSON, J. D. ; JAMES, L. M. Etiologic heterogeneity of neural tube defects: clues from epidemiology. **Amer Epidemiol** , 115:538-48, 1982.

KOCH, M. C.; STEGMANN, K.; ZIEGLER, A.; SCRÖTER, B.; ERMERT, A. Evaluation of the MTHFR C667T allele and the MTHFR gene locus in a German spina bifida population. **Eur J Pediatr**, 167: 487-92, 1998.

KOHN G, ROBINSON A. Tetraploidy in cells cultured from amniotic fluid. **Lancet**, 10; 2 (7676): 778-9, 1970.

LAMMER, E. J.; SEVER, L. E.; OAKLEY, G. P. JR. Teratogen update: valproic acid. **Teratology**, 35(3):465-73, 1987.

LARSEN, W. J. **Essentials of human embriology**. Ney York. Churchill Livingstone, 1998. 394p.

LAURENCE, K. M. The genetics and prevention of neural tube defects and “uncomplicated” hydrocephalus. IN: EMERY, A. E. H.; RIMOIN, D. L. Principles and practice of medical genetics. 2° ed. London: Crurchill Livingstone, 1992.

LAURENCE, K. M. Hydrocephalus and malformations of the central nervous system. IN: KEELING, J. K. **Fetal and neonatal pathology**. 2° ed. London: Springer, 1993.

LEMIRE, R. J. **Anencephaly**. EUA: Elsevier, 1987. p.71-95.

LOMAX BL, KALOUSEK DK, KUCHINKA BD, BARRETT IJ, HARRISON KJ, SAFAVI H. The utilization of interphase cytogenetic analysis for the detection of mosaicism. **Hum Genet**, 93(3):243-7, 1994.

LUCON, D. R.; ZANQUETTA, L. M.; CAVALCANTI, D. P. Neural tube defect with other congenital defects in a female infant presenting chimerism 47,XY,+21/46,XX. **Genetics and Molecular biology** (submetido a análise), 2004.

LURIE, I. W. ; ILYINA, H. G. ; GUREVICH, D. B. ; RUMYANTSEVA, N. V. ; NAUMCHIK, I. V. ; CASTELLAN, C. ; HOELLER, A. ; SCHINZEL, A. Analysis of unusual phenotypic findings. **Am J Med Genet** , 55: 229-36, 1995.

MARTINEZ-FRIAS, M.L.; URIOSTE, M.; BERMEJO, E.; SANCHIS, A.; RODRIGUEZ, P. E. Epidemiological analysis of multi-site closure failure of neural tube in humans. **Am J Med Genet** ,66: 64-8, 1996.

MYRIANTHOPOULOS, N. C.; MELNICK, M. Studies in neural tube defects. I. Epidemiologic and etiologic aspects. **Am J Med Genet**, 26(4):783-96, 1987.

McFADDEN, D.; KALOUSEK, D. K. Survey of neural tube defects in spontaneously aborted embryos. **Am J Med Genet** , 32: 356-8, 1989.

McCORMACK, W. M. J.R.; SHEN J. J.; CURRY, S. M.; BEREND, S. A.; KASHORK, C.; PINAR, H.; POTOCKI, L.; BEJJANI, B. A. Partial deletions of the long arm of chromosome 13 associated with holoprosencephaly and the Dandy-Walker malformation. **Am J Med Genet**, 118A(2): 384-9, 2003.

MILLS, J. L.; MCPARTLIN, J. M.; KIRKE, P. N.; LEE, Y. J.; CONLEY, M. R.; WEIR, D. G.; SCOTT, J. M. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. **Lancet**, 345:149-51, 1995.

MOORHEAD, P.; NOWELL, P.; MELLMAN, W.; BATTIPS, D. M., HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparation of leucocytes cultured from human peripheral blood. **Exp Cell Res**, 20: 613-6, 1960.

MUKHERJEE, A. B. ; THOMAS, S. ; SCHMITT, E. Chromosomal analysis in young vs. Senescent human fibroblasts by fluorescence in situ hybridization: a selection hypothesis. **Mech Ageing Dev**, 80(1): 11-23, 1995.

MUKHERJEE, A. B. ; THOMAS, S. A longitudinal study of human age-related chromosomal analysis in skin fibroblasts. **Exp Cell Res**, 235(1): 161-9, 1997.

MURTHY, S. K. ; PRABHAKARA, K. Mitotic disturbances associated with inversion 9qh. A case report. **Ann Genet**, 33(3): 169-172, 1990.

NAKATSU, T.; UWABE, C.; SHIOTA, K. Neural tube closure in humans initiates at multiple sites: evidence from human embryos and implications for the pathogenesis of neural tube defects. **Anat Embryol**, 201(6):455-66, 2000.

NEVIN, N. C. Prevention and avoidance of congenital malformations. **Philos Trans R Soc Lond B Sci**, 319(1194): 909-14, 1988.

NEVIN, N. C. Neural tube defects. **Lancet** , 2: 1290-91, 1981.

NEURATH, P.; DEREMER, K.; BELL, B.; JARVIK; KATO, T. Chromosome loss compared with chromosome size, age and sex of subjects. **Nature**, 17;225(229):281-2, 1970.

NICKEL, R. E. ; PILLERS, D. A. ; MERKENS, M. ; MAGENIS, R. E. ; DRISCOLL, D. A. ; EMANUEL, B. S. ; ZONANA, J. Velo-cardio-facial syndrome and DiGeorge sequence with meningomyelocele and deletions of the 22q11 region. **Am J Med Genet**, 52(4): 445-9, 1994.

NIELSEN, J.; KRAG-OLSEN, B. Cell selection in vivo. Follow-up of nine unselected mixoploid children. **Hum Genet**, 55(3): 357-61, 1980.

NORTHROP, H. ; VOLCIK, K. A. Spina bifida and other neural tube defects. **Curr Probl Pediatr** , 30: 317-32, 2000.

O' REILLY, G. C. ; SHIELDS, L. E. Karyotyping fr isolated neural tube defects. A report of two cases. **J Reprod Med** , 45(11): 950-2, 2000.

OU, C. Y.; STEVENSON, R. E.; BROWN, V. K.; SCHWARTZ, C. E.; ALLEN, W. P.; KHOURY, M. J.; ROZEN, R.; OAKLEY, Jr. G. P.; ADAMS, Jr. M. J. 5,10 Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am J Med Genet*, 28;63(4):610-4, 1996.

PARMAR, R. C.; SIRA, P. Prenatal diagnosis of partial trisomy 21 associated with maternal balanced translocation 46xx der 21 t(21q;22q) with pericentric inversion of chromosome 9. **J Postgrad Med**, 49(2):154-6, 2003.

PEI, L. J. ; LI, Z. ; LI, S. ; HONG, S. X. ; WANG, H. ; WANG, T. M. ; ZHAO, X. Q. ; GUAN, Y. B. ; XIAO, L. ; WANG, L. N. Sex distribution of neural tube defects and their birth outcome in high-and low- prevalence areas of China. **Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi**, 37(5):338-41, 2003.

PHILIPP, T.; KALOUSEK, D. K. Neural tube defects in missed abortions: embryoscopic and cytogenetic findings. **Am J Med Genet**, 107(1):52-7, 2002.

PHILIPP, T. ; PHILIPP, K. ; REINER, A. ; BEER, F. ; KALOUSEK, D. K. Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. **Hum Reprod**, 18(8):1724-32, 2003.

PROCTER, S. E.; WATT, J. L.; LLOYD, D. J.; DUFFTY, P. Problems of detecting mosaicism in skin. A case of trisomy 8 mosaicism illustrating the advantages of in situ tissue culture. **Clin Genet**, 25(3):273-7, 1984.

PUTZ, B.; MORRISS-KAY, G. Abnormal neural fold development in trisomy 12 and trisomy 14 mouse embryos. I. Scanning electron microscopy. **J Embryol Exp Morphol**, 66:141-58, 1981.

RAJESH, R. ; THOMAS, S. V. Prenatal screening for neural tube defects. **Natl Med J India**, 14(6):343-6, 2001.

RAMESH, K. H.; VERMA, R. S. Breakpoints in alpha, beta, and satellite III DNA sequences of chromosome 9 result in a variety of pericentric inversions. **J Med Genet**, 33(5):395-8, 1996.

RAMIREZ-ESPÍLIA, J. A.; BENAVIDES, F. G.; LACASANA-NAVARRO, M.; MARTINEZ, J. M.; GARCIA, A. M.; BENACH, J. Mortality from neural tube defects in Mexico, 1980-1997. **Salud Publica Mex**, 45(5):356-64, 2003.

RAMOS, H. I. B. - **Estudo citogenético – Molecular pela técnica de hibridização in situ fluorescente (FISH) na investigação etiológica de malformações congênitas e patologias pediátricas correlatas**. Rio de Janeiro, 1999, 127p. (Tese – Doutorado – Universidade Federal Fluminense).

REHEN, S. K. ; MCCONNELL, M. J. ; KAUSHAL, D. ; KINGSBURY, M. A. ; YANG, A. H. ; CHUN, J. Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammalian nervous system. **Proc Natl Acad Sci**, 98(23): 13361–66, 2001.

ROZEN, R. Molecular genetic aspects of hyperhomocysteinemia and its relation to folic acid. **Clin Invest Med**, 19(3):171-8, 1996.

RUANGVUTILERT, P.; DELHANTY, J. D.; RODECK, C. H.; HARPER, J. C. Relative efficiency of FISH on metaphase and interphase nuclei from non-mosaic trisomic or triploid fibroblast cultures. **Prenat Diagn**, 20(2):159-62, 2000.

SADLER, T. W. **Langman's medical embryology**. 8° ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins. 2000. 504p.

SALIHU, R; BOOS, G.; TCHUINGUEM, W.; SCHMIDT, H. Prenatal diagnosis of translocation and a single pericentric inversion 9: the value of fetal ultrasound. **J Obstet Gynaecol**,21(5):474-477,2001.

SASAGAWA, I.; ISHIGOOKA, M.; KUBOTA, Y.; TOMARU, M.; HASHIMOTO, T.; NAKADA, T. Pericentric inversion of chromosome 9 in infertile men. **Int Urol Nephrol**, 30(2): 203-7, 1998.

SAWAI, T. ; YOSHIMOTO, M. ; KINOSHITA, E. et al. Case of the chimerism in newborn infant with ambiguos genitalia. **Am J Med Genet**, 49: 428-30, 1994.

SCHERES, J. M. Human chromosome banding. **Lancet**, 1 (7755): 849, 1972.

SCHINZEL, A. **Catologue of unbalanced chromosome aberrations in man**. New York: Ed. Walter de Gruyter, 1983. 844 p.

SELLER, M. J. Neural tube defects, chromosome abnormalities and multiple closure sites for the human neural tube. **Clin. Dysmorphol**, 4(3):202-7, 1995.

SELLER, M. J. ; MOHAMMED, S. ; RUSSELL, J. ; OGILVIE, C. Microdeletion 22q11.2, Kousseff syndrome and spina bifida. **Clin Dysmorphol**, 11(2): 113-5, 2002.

SERRA, A. ; BRAHE, C. ; MILLINGTON-WARD, A. ; NERI, G. ; TEDESCHI, B. ; TASSONE, F. ; BOVA, R. Pericentric inversion of chromosome 9: prevalence in 300 Down syndrome families and molecular studies of nondisjunction. **Am J Med Genet Suppl**,7: 162-8, 1990.

SHAW, G. M.; VELIE, E. M.; SCAFFER, D. Risk of neural tube defect-affected pregnancies among obese women. **JAMA**, 275(14):1093-6, 1996.

SINGER, N. ; GERSEN, S. The value of chromosome analysis in cases of neural tube defects: a case of anencephaly associated with fetal dup(2)(p24→pter). **Pren Diag**, 7: 567-71, 1987.

SIRIKULCHAYANONTA, C. ; MADJUPA, K. ; CHONGSUWAT, R. ; PANDII, W. Do Thai women of child bearing age need pre-conceptional supplementation of dietary folate? **Asia Pac J Clin Nutr**, 13(1):69-73, 2004.

SMITHELLS, R. W.; SHEPPARD, S.; SCHORAH, C. J. Vitamin deficiencies and neural tube defects. **Arch Dis Child**, 51: 944-50, 1976.

STEVENSON, R.E.; ALLEN, W.P.; PAI, G.S.; BEST, R.; SEAVER, L.H. DEAN, J.; THOMPSON, S. Decline in prevalence of neural tube defects in a high risk region of the United State. **Pediatrics**, 106:677-83, 2000.

SPERLINGER, K. ; SALING, E. Prenatal chromosome analysis with mosaic statement 46,XX-92,XXXX. Possibility of an erroneous diagnosis. **Humangenetik**, 11(2):139-45, 1971.

TEO, S. H.; TAN, M.; KNIGHT, L.; YEO, S. H.; NG, I. Pericentric inversion 9-incidence and clinical significance. **Ann Acad Med Singapore**, 24(2):302-4, 1995.

THANGAVELU, M. ; FROLICH, G. ; ROGERS, D. Partial duplication 2p as the sole abnormality in two cases with anencephaly. **Am J Med Genet**, 124 A(2): 170-2, 2004.

THERKELSEN, A. J.; HULTÉN, M.; JONASSON, J.; LINDSTEN, J.; CHRISTENSEN, N.C.; IVERSEN, T. Presumptive direct insertion within chromosome 2 in man. **Ann Hum Genet**, 36: 367-373, 1973.

URIOSTE, M.; ROSA, A. Anencephaly and faciocranioschisis: evidence of complete failure of closure 3 of the neural tube in humans. **Am J Med Genet**, 75(1): 4-6, 1998.

VAN ALLEN, M. I. ; KALOUSEK, D. K. ; CHERNOFF, G. F. ; JUTILOFF, D. ; HARRIS, M. ; MCGILLIVRAY, B. C. ; YONG, S. L. ; LANGLOIS, S. ; MacLEOD, P. M.; CHITAYAT, D. ; FRIEDMAN, J. M. ; WINSON, R. D. ; McFADDEN, D. ; PANTZAR, J.; RITCHIE, S. ; HALL, J. G. Evidence for multi-site closure of neural tube in humans. **Am J Med Genet**, 47(5):723-43, 1993.

VAN ALLEN, M. I. - Multisite neural tube closure in humans. **Birth Defects**, 30:203-25, 1996.

VAN DER PUT, N.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P.; FROSST, P.; TRIJBELS, F. J.; ESKES, T. K.; VAN DEN HEUVEL, L. P.; MARIMAN, E. C.; DEN HEYER, M.; ROZEN, R.; BLOM, H. J. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. **Lancet**, 346:1070-1, 1995.

VON KAISENBERG, C. S.; CALIEBE, A.; KRAMS, M.; HACKELOER, B. J.; JONAT, W. Absence of 9q22-9qter in trisomy 9 does not prevent a Dandy-Walker phenotype. **Am J Med Genet**, 95(5):425-8, 2000.

ZUMEL, R. M.; DARNAUDE, M. T.; DELICADO, A.; DIAZ de BUSTAMANTE, A.; de TORRES, M. L.; LOPEZ PAJARES, I. Trisomy 20p from maternal translocation and anencephaly. Case report and genetic review. **Ann Genet**, 32(4):247-9, 1989.

WALLER, D. K.; MILLS, J. L.; CUNNINGHAM, G. C.; CONLEY, M. R.; LASSMAN, M. R.; RHOADS, G. G. Are obese women at higher risk for producing malformed offspring? **Am J Obstet Gynecol**, 170(2):541-8, 1994.

WASSERMAN, C. R.; SHAW, G. M.; SELVIN, S.; GOULD, J. B.; SYME, S. L. Socioeconomic status, neighborhood social conditions, and neural tube defects. **Am J Public Health**, 88(11):1674-80, 1998.

WENSTROM, K. D. ; JOHANNING, G. L. ; OWEN, J. ; JOHNSTON, K. E. ; ACTON, S.; CLIVER, S. ; TAMURA, T. - Amniotic fluid homocysteine levels, 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase genotypes, and neural tube closure sites. **Am J Med Genet**, 90: 6-11, 2000.

WILSON, R. D. ; DAVIES, G. ; DESILETS, V. ; REID, G. J. ; SUMMERS, A. ; WYATT, P. ; YOUNG, D. The use of folic acid for the prevention of neural tube defects and other congenital anomalies. **J Obstet Gynaecol Can**, 52(11): 959-73, 2003.

WINSOR, S. H. ; Mc GRATH, M. J. ; KHALIA, M. ; DUNCAN, A. M. A report of recurrent anencephaly with trisomy 2p23-2pter: additional evidence for the involvement of 2p24 in neural tube development and evaluation of the role for cytogenetic analysis. **Prenat. Diagn**, 17(7): 665-9, 1997.

XIAO, K.Z.; ZHANG, Z.Y.; SU, Y.M.; LIU, F.Q.; YAN, Z.Z.; JIANG, Z.Q.; ZHOU, S.F.; HE, W.G.; WANG, B.Y.; JIANG, H.P.; YANG, H.G.; LI, M.M.; JU, Z.H.; HONG, S.Q.; YAO, J.S.; XING, G.K.; LI, H.; DEN, H.Y.; YU, W.Z.; CHEN, H.X.; LIU, L.W.; BAO, G.Z.; SHANG, H.Q.; ZHOU, M.M.; CIREN, Z.M.; ZHANG, Y.J.; TAN, X.L.; LI, Y.Z.; ZHOU, G.Z.; JIA, W.G. Central nervous system congenital malformations, especially neural tube defects in 29 providences, metopolitan cities and autonomous regions of China: chinese birth defects mnitoring program. **In J Epidemiol**, 19(4): 978-82, 1990.

YAMADA, K. Population studies of INV(9) chromosomes in 4300 Japanese: incidence, Sex difference and clinical significance. **Jpn J Hum Genet**, 37(4): 293-301, 1992.

YANG, A. H. ; KAUSHAL, D. ; REHEN, S. K. ; KRIEDT, K. ; KINGSBURY, M. A ; McCONNELL, M. J. ; CHUN, J. Chromosome segregation defects contribute to aneuploidy in normal neural progenitor cells. **J Neurosci**, 12; 23(32):10454-62,2003.

YASHIMA, K.; MAITRA, A.; ROGERS, B. B.; TIMMONS, C. F.; RATHI, A.; PINAR, H.; WRIGHT, W. E.; SHAY, J. W.; GAZDAR, A. F. Expression of the RNA component of telomerase during human development and differentiation. **Cell Growth Differ**, 9(9):805-13, 1998.

9- ANEXOS

Anexo 1- Termo de consentimento dos responsáveis para a coleta de tecidos e sangue.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS PROGRAMA DE GENÉTICA PERINATAL

Título da pesquisa: **Estudo do cariótipo constitucional e dos tecidos envolvidos na lesão de crianças portadoras de DFTN por meio de análise citogenética convencional e FISH interfásico.**

Pesquisadora responsável: Danielle Ribeiro Lucon

Orientadora: Denise Pontes Cavalcanti.

A presente pesquisa tem por objetivo avaliar a frequência de anomalias cromossômicas em crianças portadoras de DFTN. Para tanto, será necessário coletar sangue e uma amostra do tecido envolvido na lesão. Este último será coletado pelo cirurgião durante a cirurgia reparadora de crinaça com espinha bífida ou encefalocele (nessas cirurgias amostras de tecidos envolvidos na lesão são rotineiramente retiradas). Nas crianças portadoras de anencefalia a amostra do tecido envolvido na lesão será retirada pelo geneticista que examinar a criança após o óbito da mesma. O sangue das crianças será coletado pela Enfermagem do Centro Obstétrico ou no Ambulatório de Genética Perinatal.

Os resultados da análise das amostras de sangue e tecidos poderão ser divididos com outros pesquisadores futuramente.

Como as amostras de sangue bem como dos demais tecidos serão coletadas por profissionais devidamente treinados e habituados a tais procedimentos durante o tratamento médico dessas crianças, essa pesquisa não acrescentará riscos adicionais às crianças portadoras de espinha bífida e encefalocele.

A participação nessa pesquisa poderá gerar um maior conhecimento sobre a doença da criança, sem que isso, infelizmente, implique em qualquer vantagem para a mesma.

Todas as informações médicas, assim como os resultados das análises citogenéticas realizadas nessa pesquisa, farão parte do prontuário médico do paciente e serão submetidos aos regulamentos do HC/CAISM-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. O sigilo também será mantido em todos os estudos colaborativos que possam advir dessa pesquisa por meio da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fim de publicação científica nenhum nome será utilizado.

A qualquer momento o paciente (no caso o responsável pelo paciente) pode solicitar informações adicionais relativas à presente pesquisa bem como se recusar a participar da mesma. A Dra. Denise Pontes Cavalcanti estará disponível para responder às questões ou preocupações (Tel: 19 3289-2888). Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações é possível contactar a secretaria do Comitê de Ética da FCM-UNICAMP (Tel: 19 3788-8936).

A não participação na presente pesquisa não compromete qualquer cuidado médico que o paciente ou a sua família recebe ou receberá futuramente no HC/CAISM-UNICAMP.

A Dra. Denise Pontes Cavalcanti pode interromper a participação do paciente nessa pesquisa a qualquer momento que julgar apropriado.

Como responsável (responsáveis) pelo(a) meu/minha filho(a) estou/estamos ciente(s) do presente termo e assumo/assumimos que sua participação na presente pesquisa é voluntária. Assim, se a qualquer momento mudar (mudarmos) de idéia, posso (poderemos) recusar a participação ou retirar o consentimento e interromper a minha (nossa) não participação na presente pesquisa sem comprometimento algum aos cuidados médicos que eu e minha família recebemos hoje ou futuramente no HC/CAISM-UNICAMP.

Nome do pai ou Responsável

Nome da mãe ou responsável

Pesquisador responsável

Data

Anexo 2- Termo de consentimento dos responsáveis para a coleta de sangue dos controles.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE GENÉTICA PERINATAL

Título da pesquisa: Estudo do cariótipo constitucional e dos tecidos envolvidos na lesão de crianças portadoras de DFTN por meio de análise citogenética convencional e FISH interfásico.

Pesquisadora responsável: Danielle Ribeiro Lucon
Orientadora: Denise Pontes Cavalcanti.

A presente pesquisa tem por objetivo avaliar a frequência de anomalias cromossômicas em crianças portadoras de DFTN. Para comparação de alguns resultados é necessário estudar também uma amostra controle. Esta amostra será estudada a partir de sangue de cordão umbilical de recém-nascido normal coletado durante o parto por profissional devidamente treinado.

Sobre a identidade dos participantes, o sigilo será mantido em todos os estudos colaborativos que possam advir dessa pesquisa por meio da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fim de publicação científica nenhum nome será utilizado.

A qualquer momento o paciente (no caso o responsável pelo paciente) pode solicitar informações adicionais relativas à presente pesquisa bem como se recusar a participar da mesma. A Dra. Denise Pontes Cavalcanti estará disponível para responder às questões ou preocupações (Tel: 19 3289-2888). Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações é possível contactar a secretaria do Comitê de Ética da FCM-UNICAMP (Tel: 19 3788-8936).

A não participação na presente pesquisa não compromete qualquer cuidado médico que o paciente ou a sua família recebe ou receberá futuramente no HC/CAISM-UNICAMP.

A Dra. Denise Pontes Cavalcanti pode interromper a participação do paciente nessa pesquisa a qualquer momento que julgar apropriado.

Como responsável (responsáveis) pelo(a) meu/minha filho(a) estou/estamos ciente(s) do presente termo e assumo/assumimos que sua participação na presente pesquisa é voluntária. Assim, se a qualquer momento mudar (mudarmos) de idéia, posso (poderemos) recusar a participação ou retirar o consentimento e interromper a minha (nossa) não participação na presente pesquisa sem comprometimento algum aos cuidados médicos que eu e minha família recebemos hoje ou futuramente no HC/CAISM-UNICAMP.

A participação dos controles nessa pesquisa tem como única finalidade o estudo do cariótipo pela técnica do FISH interfásico, a partir de sangue de cordão, para comparação posterior dos resultados com os resultados da amostra de pacientes.

Nome do pai ou Responsável

Nome da mãe ou responsável

Pesquisador responsável

Data

Anexo 5 – Distribuição dos 41 casos de DFTN de acordo com as características clínicas dos 41 casos estudados.

RF	Diagnóstico	Outras Malformações	Vitalidade	Sexo	Peso (g)	IG	IM	IP	Recorrência Familiar	Outros Malformados
1310	iniencefalia	palato fendido completo mediano	ON	M	1260	31	24	25	Anencefalia (3º filha do casal)	Síndrome down (prima 1º materna),
1454	iniencefalia	-	NM	F	370	31	18	25	-	Nanismo (tia paterna)
1552	iniencefalia	-	NV	F	3345	37	16	21	-	-
1643	iniencefalia	-	ON	F	760	26	16	17	-	Pé torto (tia paterna)
1249	anencefalia	fenda palatina submucosa, agenesia renal esquerda, útero unicorno	NV	F	1105	34	23	22	-	-
1317	anencefalia	Fenda palatina mediana	ON	F	2410	36	28	27	-	-
1333	anencefalia	Palato fendido mediano, pé torto	NM	F	1190	35	19	24	Anencefalia (2º filha do casal)	Anoftalmia unilateral (primo 2º paterno)
1348	anencefalia	-	NM	F	1130	32	39	32	-	-
1355	anencefalia	Agenesia renal e de uretra à esquerda	NM	F	380	24	25	27	-	Síndrome down (primo 2º materno), fenda labial (tio materno)
1473	anencefalia	micropênis, agenesia supra renal, discreta dilatação pielocalicial	ON	M	3085	38	17	23	-	-
1474	anencefalia	-	ON	F	680	31	15	19	-	-
1476	anencefalia	-	NM	F	420	22	25	35	-	agenesia de 4º e 5º dedos (sobrinha paterna)
1512	anencefalia	-	ON	F	510	25	26	28	-	-
1551	anencefalia	-	ON	M	1830	37	23	20	-	-
1577	anencefalia	-	NM	F	435	23	22	27	-	Agenesia renal unilateral (tia avó materna), sopro cardíaco (tia avó materna), S.Down (prima 2º materna), retardo mental (prima 2º paterno)

RF	Diagnóstico	Outras Malformações	Vitalidade	Sexo	Peso (g)	IG	IM	IP	Recorrência Familiar	Outros Malformados
1603	anencefalia	-	ON	F	1325	34	42	48	-	-
1657	anencefalia	-	ON	F	1005	31	21	25	-	-
1377	craniorraquisquise	Hérnia diafragmática	NM	F	160				Anencefalia (2° filho do casal)	
1378	craniorraquisquise	pulmão direito com 2 lobos, hipoplasia de ventrículo esquerdo, hipoplasia tubular em aorta	NM	F	970	24	19	35	-	-
1441	craniorraquisquise	-	NM	F	1375	32	21	21	-	-
1475	craniorraquisquise	-	NM	F	820	31	23	28	-	Síndrome Down(tio bisavô)
1521	craniorraquisquise	-	ON	F	1825	36	16	22	-	Malformação cardíaca (primo 2° paterno) e craniana (primo 2° paterno)
1419	EBLS L4-S2	-	NV	M	3495	39	27	36	-	-
1428	EBS	-	NV	F	1075	28	27	52	-	-
1434	EBTL T11-L3	-	NV	F	3085	39	15	23	-	Hidrocefalia isolada (primo3°), Síndrome de Down (tia materna mãe do RN)
1513	EBTL	-	NV	M	3010	38	28	49	-	Pé torto congênito (primo 2°)
1527	EBT	fusão de parte inferior do pênis com bolsa escrotal..	NV	M	3195	39	25	29	-	Deficiência mental (primo paterno), 2unhas do dedo do pé (prima 2°mãe do RN)
1558	EBTL T10-L5	-	NV	F	4040	39	20	26	-	pé torto congênito (tio da avó paterna). EB (primo e prima de 2° paternos)

RF	Diagnóstico	Outras Malformações	Vitalidade	Sexo	Peso (g)	IG	IM	IP	Recorrência Familiar	Outros Malformados
1561	EBLS L5-S4	-	NV	F	3615	41	21	23	-	Deficiencia mental leve (tia avó materna)
1568	EBTS T11-S?	Agenesia renal esquerda	NV	M	3255	40	28	31	-	-
1570	EBTS T9-S4	Discreta dilatação pilocalicial	NV	F	3200	41	16	18	-	-
1583	EBLS L1-S1	-	NV	M	3500	40	18	23	Espinha bífida (prima e primo 2°)	Deficiencia mental (primo paterno)
1607	EBLS L3-S5	-	NV	F	2710	37	19	29	-	-
1653	EBLS	-	NV	M	2850	41	17	23	-	defeito na coluna (primo 2° materno)
1661	EBLS	-	NV	F	2795	37	23	36	-	-
1346	encefalocle	-	RN	F	1730	28	23	34	-	Pé torto congênito (prima 2° materna)
1350	encefalocle	Microcefalia grave	NV	F	3950	39	23	23	-	Malformações múltiplas (primo 2° paterno), defeito de parede abdominal (primo 2° paterno)
1373	encefalocle	dilatação pielocalicial à esquerda, cisto de Dandy-Walker	NV	F	3140	40	21	26	-	Óbito neonatal de causa não especificada (primo 2° paterno)
1396	encefalocle	-	NV	F	3160	40	27	33	-	-
1486	Encefalocle	Micropênis	ON	M	2850	37	20	19	-	Surdez e cegueira (tia materna)
1594	encefalocle	Cardiopatia, hérnia diafragmática	NM	F	2410	38	18	20	-	Dextrocardia (tio materno), cardiopatia (outro tio materno e avó materna)

Anexo 6- Resultado da análise do FISH interfásico das 10 amostras controles estudados de acordo com o número de sinais encontrados em cada cromossomo.

C1	Box																		X	Y
	1	2	3	6	7	8	9	10	11	12	15	16	17	18	13	14	21	22		
1	3	-	-	2	-	1	1	-	1	-	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-
2	298	298	300	298	300	299	299	297	299	300	298	298	299	300	-	-	-	-	300	0
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6	-	-	-	-
4	-	1	-	-	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-	298	294	299	300	-	-
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
C2																				
1	-	-	-	1	1	1	4	1	-	1	3	-	3	2	-	-	-	-	1	-
2	300	300	300	299	299	299	296	299	300	299	297	299	297	298	1	-	-	3	299	0
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	4	5	1	1	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	295	295	299	296	-	-
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3																				
1	2	-	-	1	-	-	1	-	-	1	5	2	3	2	-	-	-	-	299	299
2	297	300	300	299	299	300	299	300	300	299	295	297	297	299	2	1	-	-	1	1
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	7	2	6	-	-
4	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	298	291	298	294	-	-
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
C4																				
1	4	-	1	-	-	-	3	1	-	-	3	2	3	1	-	-	-	-	300	298
2	296	300	299	300	300	300	297	299	300	300	297	298	297	299	-	2	-	-	-	2
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	1	9	2	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	291	296	291	296	-	-
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	-	-
C5																				
1	3	-	-	2	-	1	1	-	1	-	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-
2	297	300	300	298	300	299	298	297	299	300	298	298	299	300	-	-	-	-	300	0
3	-	-	-	-	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-	2	6	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	298	294	299	300	-	-
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-

C6	Box														13	14	21	22	X	Y
	1	2	3	6	7	8	9	10	11	12	15	16	17	18						
1	2	-	-	1	-	-	1	-	-	-	5	2	3	2	-	-	-	-	-	-
2	295	300	300	299	299	300	299	300	300	300	295	297	297	298	2	1	2	-	300	0
3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	7	-	6	-	-
4	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	298	291	298	294	-	-
+															-	1	-	-		
C7																				
1	-	-	-	1	-	-	4	1	-	1	3	1	3	2	-	-	-	-	-	-
2	300	300	300	299	299	300	299	299	300	299	297	299	297	298	1	-	-	3	300	299
3	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	5	1	1	-	1
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	295	295	299	296	-	-
+															-	-	-	-		
C8																				
1	2	-	-	1	-	1	3	1	1	-	3	2	3	2	-	-	-	-	-	-
2	298	300	300	299	300	299	297	299	299	300	297	297	297	298	1	-	-	3	299	299
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	4	5	1	1	1	1
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	295	295	299	296	-	-
+															-	-	-	-		
C9																				
1	4	-	1	-	-	-	3	1	-	-	3	2	3	1	-	-	-	-	1	-
2	296	300	299	300	300	300	297	299	300	300	297	298	297	298	-	2	-	-	299	0
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	9	1	3	2	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	291	296	297	298	-	-
+															-	1	-	2		
C10																				
1	4	-	1	-	-	1	3	1	-	-	3	2	2	2	-	-	-	-	300	299
2	296	300	299	300	300	299	297	299	300	300	297	297	298	298	1	2	-	1	-	2
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	6	6	6	7	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	293	291	294	292	-	-
+															-	1	-	-		

* Todos os cromossomos autossomos apresentam 2 sinais, com exceção dos cromossomos 13, 14, 21 e 22 que apresentam 4 sinais.

Anexo 7- Resumo clínicos dos casos com anomalias numéricas mostrados na Tabela 5.

- CASO 3: Recém-nascido, sexo masculino, primeiro filho de um casal jovem não consaguíneo (ela 17 e ele 23 anos) e sem relato de malformações na família. O diagnóstico pré-natal ultrassonográfico mostrou anencefalia. O parto foi normal, com 38 semanas, e o recém-nascido pesava 3.085g, morreu com uma hora de vida. Ao exame apresentava anencefalia e micropênis. A necrópsia mostrou: além da anencefalia, agenesia supra renal, discreta dilatação pielocalocial à esquerda e cisto de Dandy-Walker.
- CASO 4: Recém-nascido, sexo feminino, terceiro filho de um casal jovem não consaguíneo (ela 25 e ele 26 anos) e sem relato de malformações na família. O diagnóstico pré-natal ultrassonográfico mostrou anencefalia. Feto pesando 510g com 25 semanas. Ao exame apresentava anencefalia, sem outras malformações.
- CASO 5: Recém-nascido, sexo masculino, quarto filho de um casal jovem não consaguíneo (ela 23 e ele 20 anos) e sem relato de malformações na família. O diagnóstico pré-natal ultrassonográfico mostrou anencefalia. O parto foi normal com 37 semanas, e o feto pesava 1.830g. Ao exame apresentava anencefalia, hipoplasia de genitália.
- CASO 9: Recém-nascido, sexo feminino, primeiro filho de um casal jovem não consaguíneos (ela 20 e ele 26 anos) e com relato de malformações na família - espinha bífida em primo e prima de segundo grau paternos e pé torto congênito em tio da avó paterna. O diagnóstico pré-natal ultrassonográfico mostrou espinha bífida. O parto foi normal com 39 semanas, e o recém-nascido pesava 4.040g. Ao exame apresentava espinha bífida tóraco-lombar (Raio X: T10-L5) e hidrocefalia.
- CASO 10: Recém-nascido, sexo masculino, segundo filho de um casal jovem não consaguíneo (ela 18 e ele 23 anos) e sem relato de malformações na família. O diagnóstico pré-natal ultrassonográfico mostrou espinha bífida. O parto foi normal com 40 semanas, e o recém-nascido pesava 3.500g. Ao exame apresentava espinha bífida lombossacra (L1-S1) e hidrocefalia.

Anexo 8- Resumo clínico dos casos com alteração citogenética mostrados na Tabela 9.

- CASO 22: Recém-nascido, sexo feminino, segundo gemelar da primeira gestação de um casal jovem (ela 22 e ele 23 anos), não consanguíneo e sem relato de malformações na família. O diagnóstico pré-natal ultra-sonográfico mostrou gestação gemelar monocoriônica, diamniótica com anencefalia e alterações da coluna vertebral em um dos fetos. O parto foi prematuro, com 34 semanas, o primeiro feto, sexo feminino era normal e apresentava cariótipo normal (46,XX) e o segundo (propósito), também do sexo feminino, pesava 1.105g e morreu com uma hora de vida. Ao exame apresentava anencefalia, desproporção tronco-membros, fenda palatina submucosa, rigidez de cotovelos e camptodactilia nos dedos de ambas as mãos. O corpograma mostrou espinha bífida em vértebras cervicais, além de hemivértebras em região torácica também e ausência parcial de costelas. A necrópsia evidenciou agenesia renal esquerda e útero unicornio.

- CASO 31: Recém-nascido, sexo masculino, quarto filho de um casal jovem não consanguíneo (ela 27 e ele 36 anos) e sem relato de malformações na família. O diagnóstico pré-natal ultra-sonográfico mostrou espinha bífida. O parto foi normal com 39 semanas, e o recém-nascido pesava 3.495g. Ao exame apresentava espinha bífida lombossacra (L4-S2), hidrocefalia, prega palmar única à direita, pés tortos talovalgo bilateralmente.

- CASO 32: Recém-nascido, sexo feminino, primeiro filho de um casal jovem não consanguíneo (ela 23 e ele 36 anos) e sem relato de malformações na família. O diagnóstico pré-natal ultra-sonográfico mostrou espinha bífida. O parto foi normal com 37 semanas, e o recém-nascido pesava 2.795g. Ao exame apresentava espinha bífida lombossacra, hidrocefalia, pés tortos equinovaros.

- CASO 41: Natimorto, sexo feminino, primeiro filho de um casal jovem não consanguíneo (ela 18 e ele 20 anos) e com relato de malformações na família, cardiopatia (tio e avó materna) e dextrocardia (outro tio materno). O diagnóstico pré-natal ultra-sonográfico mostrou encefalocele. O feto pesava 2.410g e morreu durante o trabalho de parto com 38 semanas. Ao exame apresentava encefalocele, cardiopatia, hérnia diafragmática.