

*Rosana Rosa Miranda Corrêa*

# *Análise morfológica dos órgãos de stress de autopsias perinatais*

*Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, área de concentração "Patologia Geral", da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor.*

*Orientador: Eumenia Costa da Cunha Castro*

*Co-orientador: Vicente de Paula Antunes Teixeira*

*Uberaba, MG  
Março, 2007*

C844a Corrêa, Rosana Rosa Miranda.

Análise morfológica dos órgãos de stress de autópsias perinatais / Rosana Rosa Miranda Corrêa. - - 2007.

Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2007.

144 f.: tab.; fig + anexos.

Tese – Doutorado em Patologia – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2007.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eumênia Costa da Cunha Castro

1. Autópsia. 2. Perinatal. 3. *Stress*. I. Título. II.

Castro, Eumênia Costa da Cunha.

CDU – 616-091.5

*O agradecimento é a memória do coração*

*(Lao-Tsé)*



## *À Minha Família*

---

*Por todo aprendizado obtido nas diferenças, no apoio, nos exemplos, na orientação e no carinho. Ao meu sobrinho Cristiano, que torna nossa vida mais feliz com sua presença.*

*“Geralmente as pessoas tentam viver a vida de trás para frente: procuram ter mais coisas ou mais dinheiro para poderem fazer o que querem, e serem assim mais felizes. Mas é o contrário que funciona. Primeiro, você precisa ser quem realmente é e fazer o que é preciso para ter o que quer”.*

*(Margaret Young)*

## *À minha Orientadora, Eumenia*

---

*Por confiar no meu trabalho e ter me conduzido com sabedoria e amizade,  
sendo elo de ligação para realização de muitos de meus sonhos.*

*“A glória da amizade não é a mão  
estendida, nem o sorriso carinhoso, nem  
mesmo a delícia da companhia. É a  
inspiração espiritual que vem quando  
você descobre que alguém acredita e  
confia em você”.*

*A todas as pessoas que contribuíram para minha formação,  
especialmente*

---

- ◆ *Ao Professor Vicente e à Professora Marlene, pelo incentivo, pelas oportunidades e pela confiança.*
- ◆ *Aos demais colegas de trabalho da Disciplina de Patologia Geral, que contribuíram com seu trabalho e amizade para o desenvolvimento desta tese.*
- ◆ *Aos colegas do Curso de Pós-graduação, especialmente aos que participam da convivência na Disciplina de Patologia Geral, pela colaboração e pelos momentos que tornam nosso trabalho mais alegre.*
- ◆ *Às colegas de pós-graduação Renata Calciolari Rossi e Jannaína Grazielle Pacheco Olegário, por todo o trabalho durante a realização da imunohistoquímica.*
- ◆ *Às secretárias do Curso de Pós-graduação, pela atenção e gentileza, e aos demais professores e funcionários da UFTM.*
- ◆ *Aos alunos da Iniciação Científica (“meus filhos, às vezes irmãos”), pela troca de informações tão necessária para nosso aprendizado. Pelo carinho, comprometimento e responsabilidade que todos vocês dedicam aos seus trabalhos, sem dúvida o melhor retorno que poderia receber de vocês.*
- ◆ *A todos os alunos da UFTM, especialmente aos que passaram nos últimos anos pela PATGE. Agradeço pela paciência, pelas brincadeiras em sala de aula, pela atenção e respeito, condições que tornaram nosso trabalho menos desgastante e mais prazeroso.*

*Espero ter contribuído na formação de todos vocês ou quem sabe amenizar o “terror” sentido nas aulas de microscopia.*

- ◆ *À Deise, Paulo e ao Professor César, pela disponibilidade e atenção que sempre nos recebiam no Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.*
- ◆ *A todos que de alguma forma participaram da realização deste trabalho. Que vibraram com minhas conquistas, me apoiaram e contrariaram minhas idéias, questionaram o porque seguir tão rápido ou porque ir tão devagar. A todos que de alguma forma fizeram parte da minha vida neste período, pela amizade, carinho, convivência, pelos momentos de diversão compartilhados, alguns deles muito distantes da UFTM.*
- ◆ *Aos membros da comissão examinadora deste trabalho. Desde já, agradeço a todos pela disponibilidade e por todas as considerações que certamente contribuirão para melhorar nosso estudo.*
- ◆ *A todos os profissionais e pessoas da comunidade que podem reconhecer a importância da realização da autópsia, especialmente da autópsia pediátrica, e obter benefícios a partir dos resultados deste exame, que pode contribuir para a melhora da assistência perinatal, proporcionando melhores condições de vida para população.*

*Quando vejo uma criança, ela inspira-me dois sentimentos:  
ternura, pelo que é, e respeito pelo que pode vir a ser.*

*(Louis Pasteur)*

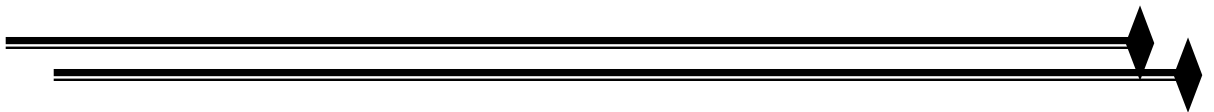
*Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).*





*"I love getting up in the morning. I clap my hands and say, 'This is going to be a great day'"*

*(Jerry Maguire, 1996)*



## Sumário

<i>Lista de Abreviaturas e Símbolos</i> .....	<i>x</i>
<i>Resumo</i> .....	<i>xii</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>xiv</i>
<i>Introdução</i> .....	<i>01</i>
<i>Hipótese e Objetivos</i> .....	<i>05</i>
<i>Material e Métodos</i> .....	<i>06</i>
<b><i>Análise segmentada</i></b>	
◆ <i>Objetivo 1. Análise antropométrica</i> .....	<i>10</i>
◆ <i>Objetivo 2. Supra-renal</i> .....	<i>28</i>
◆ <i>Objetivo 3. Timo</i> .....	<i>38</i>
◆ <i>Objetivo 4. Fígado</i> .....	<i>47</i>
◆ <i>Objetivo 5. Placenta</i> .....	<i>67</i>
<i>Considerações finais</i> .....	<i>79</i>
<i>Conclusões</i> .....	<i>80</i>
<i>Referências Bibliográficas</i> .....	<i>81</i>
<i>Anexos</i> .....	<i>97</i>

## *Lista de Abreviaturas*

$\chi^2$	.....	Qui-quadrado
$\mu m$	.....	micrômetros
"t"	.....	Teste "t" de Student
acpc	.....	Área de células positivas por campo
ACTH	.....	Hormônio Adrenocorticotrófico
ANOVA	.....	Análise da variância
g	.....	gramas
H	.....	Teste de Kruskal-Wallis
HAP	.....	Hipóxia/Anóxia Perinatal
HE	.....	Hematoxilina-eosina
HE-UFTM	.....	Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro
IA	.....	Infecção Ascendente
Max	.....	Máximo
MC	.....	Malformação Congênita
Med	.....	Mediana
Min	.....	Mínimo
n	.....	Número de casos
NA	.....	Não avaliado
NR	.....	Não realizado
PE	.....	Peso esperado para população

<i>R<sub>1A</sub></i> .....	<i>Receptor 1A</i>
<i>Pr</i> .....	<i>Coefficiente de correlação de Pearson</i>
<i>Sr</i> .....	<i>Coefficiente de correlação de Spearman</i>
<i>T</i> .....	<i>Mann-Whitney</i>
<i>TH</i> .....	<i>Triptofano-hidroxilase</i>
<i>X ± DP</i> .....	<i>Média ± Desvio padrão</i>

## Resumo

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

**Introdução:** O objetivo deste estudo foi o de avaliar através de técnicas de imunohistoquímica e morfometria a morfologia dos órgãos que apresentavam descrição na literatura de lesões morfológicas relacionadas ao stress perinatal: supra-renal (SR), timo (TI), fígado (FI) e placenta (PL), em 3 diferentes tipos de causa de morte perinatal: Hipóxia/Anóxia Perinatal (HAP), Infecção Ascendente (IA) e Malformações Congênicas (MC). **Material e Métodos:** Analisamos 146 casos, 84 (51,2%) HAP, 34 (20,7%) IA e 30 (18,4%) MC. Foi utilizada a coloração pela hematoxilina-eosina para análise da vacuolização na supra-renal, quantificação da esteatose hepática e quantificação das áreas de eritropoiese extramedular no FI. Para análise da fibrose no FI foi utilizada a coloração pelo método do Picro-sírius. Para a marcação do número de macrófagos foi utilizado o anticorpo anti CD68 (DAKO®) e para detecção da Triptofano-hidroxilase (*Tryptophan Hydroxylase antibody*–Novus Biologicals®) e do Receptor 1A (*Melatonin Receptor 1A antibody* – Novus Biologicals®). **Resultados:** Do total de autópsias avaliadas os casos com HAP e IA tiveram maior natimortalidade ( $p < 0,001$ ). A autólise foi observada em 70 (42,7%) casos, sendo mais frequentes nos casos com HAP ( $p < 0,001$ ). Das 95 SR avaliadas, o padrão discreto de vacuolização foi observado em 50 (52,6%) dos casos, 21 (22,1%) apresentaram o padrão moderado e 24 (25,3%) o acentuado. O grau de vacuolização foi maior nos casos com IA ( $p = 0,008$ ). O conteúdo dos vacúolos era de natureza lipídica comprovado pela coloração do Sudam III positiva. No timo o número de macrófagos foi significativamente maior nos

24 casos com HAP ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença em relação à frequência de  
25 esteatose entre os grupos de causa de morte. Houve correlação positiva e  
26 significativa entre o grau de esteatose e a idade gestacional (Sr: 0,359,  $p =$   
27 0,002). No fígado os casos com HAP e IA apresentaram maior porcentagem de  
28 fibrose hepática. Os focos de eritropoiese variaram de acordo com a idade  
29 gestacional sendo mais freqüente nos prematuros independente da causa de  
30 morte ( $p = 0,012$ ). A marcação para anti-triptofano-hidroxilase demonstrou  
31 padrão citoplasmático no trofoblasto e nas células inflamatórias do espaço  
32 interviloso e para anti-receptor 1A de melatonina demonstrou a marcação  
33 destas mesmas estruturas e da célula endotelial. A porcentagem de área de  
34 células positivas por campo para expressão de triptofano-hidroxilase e receptor  
35 1A para melatonina foi significativamente maior nos casos com *stress* intra-  
36 uterino ( $p = 0,012$ ). **Conclusões:** A análise dos diferentes parâmetros  
37 antropométricos contribuiu para melhorar a interpretação dos achados da  
38 autópsia perinatal. Com a melhora da assistência perinatal e a sobrevivência  
39 dos prematuros expostos a estímulos como HAP e IA, a descrição das lesões  
40 morfológicas dos órgãos de *stress* nestes fetos pode ajudar nos futuros estudos  
41 relacionados aos fetos expostos ao stress intra-uterino, e na prevenção das  
42 doenças na infância relacionadas à hiper reatividade da supra-renal a  
43 estímulos hormonais; imunodepressão do timo, fibrose hepática e lesões  
44 causadas pela produção de radicais livres.

45

46 **Palavras-chave:** Autópsia. Perinatal. Stress. Melatonina

47

## *Abstract*

**Introduction:** The aim of this study was evaluated through immunohistochemical and morphometrical techniques the morphology of the organs that had been previously described in the literature as stress organs, with morphological injuries due to perinatal stress: adrenal gland (AG), thymus (TY), liver (LI) and placenta (PL), in 3 different types of perinatal death: Perinatal Hypoxia/Anoxia (PHA), Ascending Infection (AI) and Congenital Malformations (CM). **Material and Methods:** We analyzed 146 cases, 84 (51,2 %) PHA, 34 (20,7 %) AI and 30 (18,4 %) CM. The hematoxylin-eosin stain was used to the analysis of the adrenal gland vacuolization; hepatic steatosis and extramedullary erythropoiesis quantification in the LI. For the LI fibrosis the Picro Sirius staining was used. For the immunohistochemical analyses we used the antibodies CD68 (DAKO®), Anti-Tryptophan Hydroxylase antibody-Novus Biologicals®) and Anti-Melatonin Receptor 1A antibody – Novus Biologicals®. **Results:** From the total evaluated autopsies the cases with PAH and AI had the bigger rate of stillborns babies ( $p < 0,001$ ). The autolysis was observed in 70 (42,7 %) cases, being more frequent in the cases with PAH ( $p < 0,001$ ). Of the 95 evaluated AG, the discreet standard of vacuolization was observed in 50 (52.6 %) of the cases, 21 (22.1 %) presented the moderate standard and 24 (25.3 %) the severe. The degree of vacuolization was higher in the cases with AI ( $p = 0.008$ ). The material was of lipid nature as proved by the positive coloration for Sudan III. In the thymus the number of macrophages was significantly higher in the cases with PAH ( $p < 0.001$ ). There

25 was no difference regarding the frequency of steatosis between the groups of  
26 cause of death. There was a positive and significant correlation between the  
27 degree of steatosis and the gestational age (Sr: 0.359, p = 0.002). In the liver  
28 the cases with PAH and AI presented the bigger percentage of hepatic fibrosis.  
29 The focuses of erythropoiesis varied in accordance with the gestational age,  
30 being more frequent in the premature independently of the cause of death (p =  
31 0,012). The Anti-tryptophan-hydroxylase marker demonstrated cytoplasmic  
32 stain in the trophoblast and in the inflammatory cells of the intervillous space  
33 and for Anti- Melatonin Receptor 1A antibody the same structures were  
34 marked plus endothelial cell cytoplasm. The percentage of area of positive cells  
35 expression per field for the Anti-tryptophan-hydroxylase and Anti- Melatonin  
36 Receptor 1A was significantly higher in the cases with intrauterine stress  
37 (p=0,012). **Conclusions:** The analysis of the different anthropometrics  
38 parameters contributed to improve the interpretation of the perinatal autopsy  
39 findings. With the improvement of the perinatal care and the survival of the  
40 premature which had been exposed to intrauterine stimulus like PAH and AI,  
41 the description of the morphological injuries of the stress organs will help in  
42 future autopsy studies, and in the prevention of the diseases in the childhood  
43 such as hiper reactivity of the adrenal gland to hormones stimuli; thymus  
44 immunodepletion, hepatic fibrosis and injuries caused by the free radicals  
45 production.

46

47 **Key words:** Autopsy. Perinatal. Stress. Melatonin.



1

2

## *Introdução*

3

4

5

6

7

8

9

A melhora do atendimento de saúde nos últimos anos tem aumentado a sobrevivência de crianças nascidas de partos com complicações gestacionais variadas (Callaghan e cols. 2006; Deulofeut e cols. 2006). Com o aumento deste tipo de pacientes a demanda por tratamento na perinatologia se tornou um desafio para todos os profissionais desta área (Georgsdottir e cols. 1989; Roy e cols. 2006).

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

Uma das formas de estabelecer diagnósticos mais precisos é através da autópsia pediátrica das crianças que vão a óbito. Para o obstetra, contribui para dar respostas não conseguidas durante o atendimento clínico, redução da causa de morte devido a um maior entendimento das doenças, e ainda pode alterar ou até definir novos diagnósticos. Pode melhorar a prevenção, por fornecer parâmetros para análise de futuras gestações e também por definir as principais causas de mortalidade em uma região (Kunzel e Misselwitz, 2003; Pinar 2004). Para a família, pode fornecer parâmetros para um melhor aconselhamento genético. Portanto, o exame proporciona o controle de qualidade do atendimento perinatal, pois nele muitas alterações são mais freqüentemente diagnosticadas e podem ser pesquisados vários aspectos da fisiologia e patologia perinatal (D'Argenio e cols. 1995).

22

23

24

Na patologia pediátrica o material enviado para exame exige que o patologista entenda bem a morfologia dos órgãos em desenvolvimento para correta interpretação das alterações morfológicas diagnosticadas no exame Corrêa RRM. Análise morfológica dos órgãos de stress de autópsias perinatais. Tese de Doutorado, UFTM, 2007.

25 anatomopatológico perinatal (Dakovic-Bjelakovic e cols. 2006). As doenças do  
26 período perinatal possuem repercussões de origem materna, fetal ou  
27 placentária. Esta variação origina várias formas de classificação para as  
28 causas de morte perinatal, interferindo na comparação das estatísticas  
29 regionais (Ngoc e cols. 2006).

30 As causas de morte no período perinatal estão relacionadas a variáveis  
31 como a idade gestacional, características étnicas (Alexander e cols. 2006),  
32 diferenças sócio-econômicas entre os países e atendimento em hospitais de  
33 referência, que superestimam a taxa de causa de morte (Ngoc e cols. 2006).  
34 Entre as principais causas de morte no mundo estão as infecções e a asfixia  
35 perinatal que ocorrem em 30% dos casos, a prematuridade contribuindo com  
36 cerca de 27% dos casos e as malformações congênitas diagnosticadas em 18%  
37 das autópsias (Mattos e cols. 1987; Sims e Collins 2001, Ngoc e cols. 2006). A  
38 mortalidade perinatal ainda é elevada no Brasil, com diferenças importantes  
39 no nível nacional e regional, muitas vezes atribuídas à forma de classificação  
40 desses óbitos (Fonseca e Coutinho 2004). Em estudos realizados em autópsias  
41 no sudeste do Brasil, a prematuridade foi observada em 39,1%, as anomalias  
42 congênitas foram diagnosticadas em 31,5%, a asfixia perinatal em 6,2% e a  
43 infecção ascendente em 2,5% dos casos (Peres 2006).

44 Certos hormônios regulam a forma, a estrutura e o crescimento geral do  
45 organismo (Beraldo 1978; Gicquel e Le Bouc 2006). Durante a gestação  
46 funcionam como indutoras de *stress* as diversas complicações gestacionais,  
47 onde o feto pode desenvolver mecanismos de compensação funcional ou  
48 alterações morfológicas em diversos órgãos (Delprado e Baird 1984b; Jones e

49 cols. 2006). O diagnóstico e os possíveis efeitos das lesões na sobrevivência  
50 neonatal frequentemente sofrem interferência de condições fisiológicas da  
51 criança, modificando as características morfológicas de alguns órgãos, que se  
52 denominam “órgãos de *stress*”. Entre os principais estão as supra-renais, o  
53 coração com alterações do miocárdio em condições de asfixia perinatal, acidose  
54 ou choque; os rins mais suscetíveis a efeitos da hipoperfusão, o fígado, os  
55 pulmões nos casos de broncopneumonite e prematuridade, o pâncreas de  
56 crianças filhas de mães diabéticas, o timo e a placenta (Bendon e Coventry  
57 2004). Quando os animais ou o homem se expõem a estímulos nocivos como  
58 baixas temperaturas, calor exagerado, queimaduras e anóxia, ocorre ativação  
59 do sistema hormonal hipotálamo, hipófise e supra-renal. Há aumento da  
60 secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e, conseqüentemente,  
61 elevação das taxas de glicocorticóides. Essa elevação é essencial para a  
62 sobrevivência por oferecer maior resistência a estímulos nocivos. Ocorre a  
63 seguinte seqüência de eventos: estímulos nocivos, seguidos por descarga do  
64 fator liberador de corticotrofina do hipotálamo e atuação sobre a hipófise, que  
65 passa a secretar grandes quantidades de ACTH (Beraldo, 1978). Este fator  
66 liberador de corticotrofina possui propriedades biológicas semelhantes a outros  
67 peptídeos isolados na placenta e em outros sítios extra-hipotalâmicos (Majzoub  
68 e Karalis 1999). A diferença é o tipo de regulação, onde a corticotrofina  
69 hipotalâmica é inibida pelo o aumento de cortisol, e a placentária é estimulada  
70 pelo o aumento dos glicocorticóides, um dos fatores envolvidos nos mecanismos  
71 do início do trabalho de parto (Pike 2005). Nesse estado instala-se a o estado de  
72 *stress*, que pode ser definido como uma condição desfavorável com alterações

73 no sistema hormonal, estímulo para produção de ACTH, e conseqüentemente a  
74 produção de cortisol, resultando do *stress* uma tentativa de adaptação às  
75 condições do ambiente (Delprado e Baird 1984b; Jones e cols. 2006).

76 Frente às inúmeras contribuições que a autópsia pode oferecer é  
77 importante estabelecer técnicas e métodos de análise que melhorem sua  
78 efetividade, distinguindo as alterações morfológicas em cada tipo de causa de  
79 morte. Portanto, neste estudo, busca-se avaliar as alterações morfológicas dos  
80 órgãos de *stress* de crianças autopsiadas no período perinatal e sua relação  
81 com a causa de morte.

## *Hipótese*

Existem diferenças morfológicas nos órgãos de *stress* de acordo com a causa de morte das crianças autopsiadas no período perinatal.

## *Objetivo Geral*

Avaliar a morfologia dos órgãos de *stress* como a supra-renal, o timo, o fígado e a placenta através de técnicas de imunohistoquímica e morfometria, nos diferentes tipos de causa de morte perinatal.

## *Objetivos Específicos*

1. Analisar as características antropométricas das autópsias perinatais e sua variação de acordo com a causa de morte;
2. Comparar entre os tipos de causa de morte as alterações morfológicas nas supra-renais coletadas das autópsias perinatais;
3. Comparar entre os tipos de causa de morte as alterações morfológicas localizadas no timo coletado das autópsias perinatais;
4. Comparar entre os tipos de causa de morte as alterações morfológicas localizadas no fígado coletado das autópsias perinatais;
5. Comparar entre os tipos de causa de morte a imunomarcção anti-receptor 1A para melatonina e anti-triptofano-hidroxilase nas placentas de autópsias perinatais.

## *Material e Métodos*

### *Aspectos éticos do projeto*

O projeto foi aprovado no dia 08/04/2005 pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), protocolo número 577 (Anexo I).

### *Revisão dos protocolos de autópsias e do prontuário médico*

Foram avaliados retrospectivamente 467 protocolos de autópsias realizadas na Disciplina de Patologia Geral da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, durante os anos de 1990 a 2005. Na faixa etária pediátrica foram autopsiados 195 casos. Foram incluídos os casos de autópsias pediátricas realizadas no período perinatal, de 22 semanas de gestação até sete dias de vida pós-natal (OMS 1996), com protocolos e prontuários completos e blocos e lâminas disponíveis nos arquivos da Disciplina de Patologia Geral. Foram excluídos os casos de autópsias pediátricas com prontuários e protocolos incompletos e blocos e lâminas não disponíveis nos arquivos analisados, sendo obtidos 164 casos de autópsias perinatais.

### *Seleção dos grupos para análise morfológica dos órgãos de stress*

Foram incluídos para análise morfológica 148 casos com causa de morte classificada nos grupos de Malformações Congênitas, Hipóxia/Anóxia Perinatal antes do parto ou intraparto e Infecção Ascendente. Foram excluídas da Corrêa RRM. Análise morfológica dos órgãos de stress de autópsias perinatais. Tese de Doutorado, UFTM, 2007.

24 análise as autópsias com outras causas de morte. Os grupos de causa de morte  
25 foram definidos de acordo com os critérios estabelecidos na literatura (Hey,  
26 Lloyd e Wigglesworth 1986) em:

27 **Malformações Congênicas:** defeitos morfológicos de um órgão ou grande extensão  
28 corporal causados por uma alteração intrínseca no desenvolvimento do  
29 embrião. Neste grupo foram classificados 30 autópsias, sendo incluídos os casos  
30 com malformações congênicas cujo mecanismo que levou a morte foi hipóxia  
31 aguda, como malformações renais com hipoplasia pulmonar e malformações do  
32 sistema nervoso central, sendo excluídos os casos de malformações cujo  
33 mecanismo de causa de morte foi hipóxia crônica.

34 **Hipóxia/Anóxia Perinatal:** interferências em todas as trocas gasosas originadas,  
35 antes ou durante o parto, independente de ser natimorto, com alterações após o  
36 nascimento podendo ser provocadas por redução de oxigênio, retenção de gás  
37 carbono e acidose. É caracterizada por pequenas áreas hemorrágicas na pleura  
38 visceral e parietal, congestão hepática, no baço e na supra-renal, mecônio ou  
39 debris amniótica no pulmão.

40 **Infecção Ascendente:** infiltração de células polimorfonucleares nas membranas  
41 placentárias e/ou cordão umbilical e vasos fetais do prato coriônico. O  
42 diagnóstico de Infecção Ascendente fetal foi realizado através da análise do feto  
43 ou neonato e das placentas. Na placenta o infiltrado inflamatório foi dividido  
44 de acordo com a localização em: I – Deciduíte, quando localizado na decídua  
45 isoladamente; II – Corioamnionite, com células inflamatórias localizadas no  
46 espaço subcoriônico e/ou na membrana corioamniótica; III – Funisite, com  
47 infiltrado inflamatório na parede dos vasos do cordão umbilical e/ou na geléia;

48 IV – Vasculite, quando existe inflamação localizada nos vasos fetais localizados  
49 no córion da placenta; e V – Pneumonite, com infiltrado inflamatório localizado  
50 nos alvéolos pulmonares (Dollner e cols. 2002).

51 **Outros diagnósticos:** óbito devido a outras condições fetais e neonatais não  
52 incluídas nos grupos anteriores.

53

#### 54 *Análise Morfológica*

55 Para análise morfológica foram excluídos os órgãos com autólise. Foram  
56 avaliados os seguintes órgãos: o fígado, o timo, a supra-renal e a placenta. Após  
57 o pareamento pela idade gestacional, foi obtido um número variável de casos  
58 em cada órgão analisado, na dependência de blocos e reservas arquivados na  
59 Disciplina de Patologia Geral, necessários para confecção das técnicas  
60 utilizadas no trabalho.

61 Os fragmentos foram submetidos à fixação pelo formaldeído tamponado  
62 a 10 %. Posteriormente o material foi incluído em parafina e processado para a  
63 análise histoquímica, imunohistoquímica e morfométrica, de acordo com o que  
64 foi avaliado em cada órgão.

65 As medidas foram realizadas utilizando-se uma câmara de vídeo  
66 acoplada a um microscópio de luz comum e a um computador com um sistema  
67 analisador de imagens (KS 300 Zeiss®). A determinação do número de medidas  
68 foi utilizada através do Método da Média Acumulada (Williams 1977). Em cada  
69 parâmetro avaliado, o grupo com maior número de campos estabelecidos pelo  
70 método foi utilizado para determinação da quantidade de medidas realizadas.

71



72 *Análise Estatística*

73 Para a análise estatística foi elaborada uma planilha eletrônica no  
74 Microsoft Excell®. As informações foram analisadas utilizando-se o programa  
75 eletrônico SigmaStat® versão 2.0. Os testes estatísticos foram escolhidos de  
76 acordo com os objetivos a serem analisados e serão descritos separadamente  
77 para cada objetivo. Foram consideradas estatisticamente significativas as  
78 diferenças em que o nível de significância foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).



24 Muitos fatores influenciam nas características da população atendida  
25 nos serviços de saúde como a variação étnica, social e o nível econômico, bem  
26 como o nível de cuidado da população. Nos casos de autópsia, os padrões não  
27 podem ser considerados integralmente como iguais à população normal, devido  
28 à influência da doença nos parâmetros corporais (Maroun e Graem 2005). Além  
29 disso, a maioria dos estudos sobre morte fetal avalia as alterações em relação  
30 aos parâmetros maternos, pouco enfatizando o feto ou recém-nascido  
31 individualmente e seus processos clínicos e patológicos que podem contribuir  
32 para explicar a morte perinatal (Hey, Lloyd e Wigglesworth 1986). Portanto, é  
33 relevante que os serviços de anatomia-patológica estabeleçam padrões para  
34 análise de seu material (Maroun e Graem 2005).

35 A hipótese deste estudo é que existem diferenças nos parâmetros  
36 antropométricos fetais de acordo com a causa de morte. O objetivo deste estudo  
37 é avaliar as variações antropométricas das crianças autopsiadas no período  
38 perinatal de acordo com a causa de morte.

39

39 *Material e Métodos*

40 Foram avaliados retrospectivamente 467 protocolos de autópsias  
41 realizadas na Disciplina de Patologia Geral da Universidade Federal do  
42 Triângulo Mineiro, durante os anos de 1990 a 2005. Foram incluídos os casos  
43 de autópsias pediátricas realizadas no período perinatal, de 22 semanas de  
44 gestação até sete dias de vida pós-natal (OMS 1996), com protocolos e  
45 prontuários completos e blocos e lâminas disponíveis nos arquivos da  
46 Disciplina de Patologia Geral. Foram excluídos os casos de autópsias  
47 pediátricas com prontuários e protocolos incompletos e blocos e lâminas não  
48 disponíveis nos arquivos analisados. Após aplicação dos critérios de inclusão e  
49 exclusão dos 195 casos de autópsia pediátrica realizadas no período. Excluindo  
50 os casos com autólise grave que impedia a determinação da causa de morte,  
51 foram obtidos 164 casos (Anexo II).

52

53 *Revisão dos protocolos de autópsia e dos prontuários*

54 Foram coletadas dos protocolos de autópsia e do prontuário da mãe e/ou  
55 do recém-nascido, informações como as medidas antropométricas da criança, o  
56 peso, a idade gestacional, as intercorrências clínicas maternas e das crianças,  
57 além do peso e as características morfológicas macroscópicas e microscópicas  
58 dos órgãos. A idade gestacional foi determinada através do comprimento hálux-  
59 calcâneo (Streeter 1920; Zago e cols. 2000). Foram consideradas prematuras as  
60 crianças com idade gestacional abaixo de 37 semanas (OMS e FIGO 1976), e  
61 natimortos, crianças com idade gestacional maior que 20 semanas e com índice  
62 de Apgar zero no primeiro minuto (Apgar 1953; Faye-Petersen e cols. 1999). Os

63 pesos encontrados foram comparados com o de estudos populacionais, de  
64 acordo com os valores estabelecidos para idade gestacional (Gruenwald e Minh  
65 1961) (Anexo III).

66

### 67 *Caracterização dos grupos*

68 Após a análise dos protocolos e prontuários, foi realizada uma revisão do  
69 exame microscópico, sendo estabelecido as seguintes causas de morte, de  
70 acordo com os critérios estabelecidos na literatura (Hey, Lloyd e Wigglesworth  
71 1986):

72 ***Malformações Congênitas:*** defeitos morfológicos de um órgão ou grande extensão  
73 corporal causados por uma alteração intrínseca no desenvolvimento do  
74 embrião.

75 ***Hipóxia/Anóxia Perinatal:*** interferências em todas as trocas gasosas originadas,  
76 antes ou durante o parto, independente de ser natimorto, com alterações após o  
77 nascimento podendo ser provocadas por redução de oxigênio, retenção de gás  
78 carbono e acidose. É caracterizada por pequenas áreas hemorrágicas na pleura  
79 visceral e parietal, congestão hepática, no baço e na supra-renal, mecônio ou  
80 *debris* amniótica no pulmão.

81 ***Infecção Ascendente:*** infiltração de células polimorfonucleares nas membranas  
82 placentárias e/ou cordão umbilical e vasos fetais do prato coriônico. O  
83 diagnóstico de Infecção Ascendente fetal foi realizado através da análise do feto  
84 ou neonato e das placentas. Na placenta o infiltrado inflamatório foi dividido  
85 de acordo com a localização em: I – Deciduíte, quando localizado na decídua  
86 isoladamente; II – Corioamnionite, com células inflamatórias localizadas no  
Corrêa RRM. Análise morfológica dos órgãos de stress de autópsias perinatais. Tese de Doutorado, UFTM, 2007.

87 espaço subcoriônico e/ou na membrana corioamniótica; III – Funisite, com  
88 infiltrado inflamatório na parede dos vasos do cordão umbilical e/ou na geléia;  
89 IV – Vasculite, quando existe inflamação localizada nos vasos fetais no córion  
90 da placenta; e V – Pneumonite, com infiltrado inflamatório localizado nos  
91 alvéolos pulmonares (Dollner e cols. 2002).

92 **Imaturidade Pulmonar:** crianças com imaturidade estrutural pulmonar  
93 apresentando idade gestacional menor do que 27 semanas ao nascimento.

94 **Isoimunização:** óbito devido à incompatibilidade sanguínea materno-fetal.

95 **Membrana Hialina:** óbito por imaturidade pulmonar e deficiência da produção de  
96 surfactante.

97 **Trauma no parto:** óbito durante ou após o nascimento.

98 **Miscelânea:** óbito devido a outras específicas condições fetais e neonatais não  
99 incluídas nos grupos anteriores.

100 As variáveis foram testadas para verificar o tipo de distribuição através  
101 do teste de Kolmogorov-Smirnov e análise das variâncias. A distribuição não  
102 foi normal, sendo utilizado o teste de Kruskal-Wallis (H) na comparação entre  
103 três ou mais grupos, seguido pelo teste de Dunn quando necessário. Neste tipo  
104 de distribuição os resultados foram expressos em mediana, e valores  
105 correspondentes a 25% e 75% (Med – 25% - 75%). As proporções foram  
106 comparadas pelo teste do  $\chi^2$ . O peso encontrado e os valores estabelecidos para  
107 estudos populacionais foram comparados através do teste "t" de Student para  
108 uma média. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças  
109 em que o nível de significância foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

110 Corrêa RRM. Análise morfológica dos órgãos de stress de autópsias perinatais. Tese de Doutorado, UFTM, 2007.

110 **Resultados**

111 Das 467 autópsias realizadas pela Disciplina de Patologia Geral da  
112 Universidade Federal do Triângulo Mineiro, de 1990 a 2005, 195 (41,8%) eram  
113 da faixa etária perinatal, sendo que a causa de morte foi estabelecida em 164  
114 (84,1%) casos. A maioria dos casos, 84 (51,2%), apresentou morte por  
115 Hipóxia/Anóxia Perinatal, seguida por 34 (20,7%) casos com Infecção  
116 Ascendente, 30 (18,4%) com Malformações Congênicas, 5 (3%) miscelânea, 5  
117 (3%) membrana hialina, 4 (2,5%) imaturidade pulmonar, 1 (0,6%) trauma e 1  
118 (0,6%) por isoimunização (Tabela 1).

119

120 Tabela 1. Descrição da frequência das causas de morte encontradas nas  
121 autópsias perinatais.

122

Grupos	n (%)
Malformação Congênita	30 (18,4)
Hipóxia/Anóxia Perinatal	84 (51,2)
Infecção Ascendente	34 (20,7)
Membrana Hialina	5 (3,0)
Miscelânea	5 (3,0)
Imaturidade Pulmonar	4 (2,5)
Isoimunização	1 (0,6)
Trauma	1 (0,6)
Total	164 (100,0)

123

123           Devido à variação do número de casos entre os grupos, para análise  
124 estatística foram considerados os grupos com maior número de casos:  
125 Malformação Congênita, Hipóxia/Anóxia Perinatal e Infecção Ascendente.  
126 Comparando a frequência destes casos durante os anos, os casos de  
127 Hipóxia/Anóxia Perinatal foram predominantes de 1990 a 2006, e houve  
128 aumento dos casos com Malformação Congênita (Tabela 2).

129

130 Tabela 2. Frequência das causas de morte nas autopsias perinatais entre os  
131 anos.

132

Grupos	1990-1994 n (%)	1995-1999 n (%)	2000-2005 n (%)	Total n (%)
MC	2 (6,6)	8 (26,7)	20 (66,7)	30 (100)
HAP	27 (32,1)	24 (28,6)	33 (39,3)	84 (100)
IA	9 (26,5)	8 (23,5)	17 (50,0)	34 (100)
Membrana hialina	2 (40,0)	2 (40,0)	1 (20,0)	5 (100)
Miscelânea	1 (20,0)	0	4 (80,0)	5 (100)
Imaturidade Pulmonar	1 (25,0)	1 (25,0)	2 (50,0)	4 (100)
Isoimunização	0	1 (100)	0	1 (100)
Trauma	1 (100)	0	0	1 (100)
Total	43 (26,2)	44 (26,8)	77 (47,0)	164 (100)

133  $\chi^2= 9,400$ ;  $p = 0,052$  (entre os grupos com MC: Malformação Congênita; HAP:  
134 Hipóxia/Anóxia Perinatal; IA: Infecção Ascendente).

135

136           O sexo foi determinado em 160 casos, sendo 86 (52,4) foram do gênero  
137 masculino e 74 (45,1%) do feminino. A frequência de nativos foi 84 (51,2%) e  
138 de natimortos foi 80 (48,8%). Entre os nativos, a média do tempo de vida pós-  
139 natal foi de 21,3 horas.

140



140 No grupo de Hipóxia/Anóxia Perinatal e Infecção Ascendente, a  
141 natimortalidade foi mais freqüente (Tabela 3).

142 Tabela 3. Frequência de natimortos entre os grupos de causas de morte nas  
143 autopsias perinatais.

144

Grupos	Nativos n (%)	Natimortos n (%)	Total n (%)
MC	25 (83,3)	5 (16,7)	30 (100)
HAP	35 (41,7)	49 (58,3)	84 (100)
IA	13 (38,2)	21 (61,8)	34 (100)
Membrana hialina	5 (100)	0	5 (100)
Miscelânea	2 (40)	3 (60)	5 (100)
Imaturidade pulmonar	3 (75)	1 (25)	4 (100)
Isoimunização	1 (100)	0	1 (100)
Trauma	1 (100)	0	1 (100)
Total	85 (51,8)	79 (44,2)	164 (100)

145  $\chi^2 = 17,525$ ;  $p < 0,001$  (entre os grupos com MC: Malformação Congênita; HAP:  
146 Hipóxia/Anóxia Perinatal; IA: Infecção Ascendente).  
147

147 Quanto ao tempo de gestação, 32 (19,5%) apresentaram gestação a  
148 termo e 132 (80,5%) foram prematuros, e a frequência de prematuros foi maior  
149 em todos os grupos (Tabela 4).

150

151 Tabela 4. Frequência de termo e prematuro nos grupos de causas de morte nas  
152 autopsias perinatais.

153

Grupos	Termo n (%)	Prematuro n (%)	Total n (%)
MC	5 (16,7)	25 (83,3)	30 (100)
HAP	21 (25)	63 (75)	84 (100)
IA	5 (14,7)	29 (85,3)	34 (100)
Membrana hialina	0	5 (100)	5 (100)
Miscelânea	1 (20)	4 (80)	5 (100)
Imaturidade pulmonar	0	4 (100)	4 (100)
Isoimunização	0	1 (100)	1 (100)
Trauma	0	1 (100)	1 (100)
Total	32 (19,5)	132 (80,5)	164 (100)

154  $\chi^2 = 1,965$ ;  $p = 0,374$  (entre os grupos com MC: Malformação Congênita; HAP:  
155 Hipóxia/Anóxia Perinatal; IA: Infecção Ascendente).

156

156 A autólise foi observada em 70 (42,7%) casos, sendo mais freqüente nos  
157 casos com Hipóxia/Anóxia Perinatal, e menos freqüente nos casos com  
158 Malformações Congênicas (Tabela 5).

159

160 Tabela 5. Freqüência de autólise entre os grupos de causas de morte nas  
161 autopsias perinatais.

162

Grupos	Com autólise n (%)	Sem autólise n (%)	Total n (%)
MC	2 (6,7)	28 (93,3)	30 (100)
HAP	49 (58,3)	35 (41,7)	84 (100)
IA	14 (41,2)	20 (58,8)	34 (100)
Membrana hialina	1 (20)	4 (80)	5 (100)
Miscelânea	2 (40)	3 (60)	5 (100)
Imaturidade pulmonar	2 (50)	2 (50)	4 (100)
Isoimunização	0	1 (100)	1 (100)
Trauma	0	1 (100)	1 (100)
Total	70 (42,7)	94 (57,3)	164 (100)

163  $\chi^2 = 24.093$ ;  $p < 0,001$  (entre os grupos com MC: Malformação Congênita; HAP:  
164 Hipóxia/Anóxia Perinatal; IA: Infecção Ascendente).

165

165 Comparando o peso dos órgãos em relação à autólise, somente o baço  
 166 apresentou peso significativamente maior quando comparado com os casos não  
 167 macerados. O peso das crianças com Hipóxia/Anóxia Perinatal, membrana  
 168 hialina e Infecção Ascendente, foi maior do que o esperado para a população  
 169 (Tabela 6).

170

171 Tabela 6. Distribuição do peso perinatal esperado para a idade gestacional  
 172 entre os grupos de causas de morte nas autópsias perinatais.

173

Grupos	n (%)	Idade Gestacional (semanas) X ± DP	Peso Perinatal (gramas) X ± DP	PE (gramas)	♦p
Malformação Congênita	30 (18,5)	34,1 ± 2,7	2168,4 ± 847,2	1838	<0,05
Hipóxia/Anóxia Perinatal	84 (51,2)	31,8 ± 5,7	1834,6 ± 1090,1	1488	<0,05
Infecção Ascendente	34 (20,7)	30,2 ± 6,2	1567,4 ± 1018,9	1230	<0,05
Membrana Hialina	5 (3,0)	28,8 ± 4,4	1607,2 ± 820,1	1125	>0,05
Miscelânea	5 (3,0)	33,2 ± 5,4	2064,0 ± 1016,7	1663	>0,05
Imaturidade pulmonar	4 (2,5)	22,5 ± 2,1	515,0 ± 189,1	460	>0,05
Isoimunização	1 (0,6)	26,0	2170,0	845	NR
Trauma	1 (0,6)	31,0	1030,0	1359	NR
Total	164 (100)				

174 ♦"t" de Student para uma média. NR: Não realizado. PE: Peso Esperado para  
 175 população

176

176 Não houve diferença significativa do peso do encéfalo, fígado, coração  
177 entre os grupos quando comparados ao esperado pela idade gestacional. Os  
178 demais órgãos apresentaram alteração significativa do peso esperado para a  
179 gestação em alguns grupos: o peso dos pulmões foi maior nos casos com  
180 Infecção Ascendente e menor nos casos com Malformação Congênita; o peso do  
181 baço foi maior nos casos com Infecção Ascendente e menor nos casos com  
182 imaturidade pulmonar; no grupo classificado como miscelânea, o peso do timo  
183 foi menor do que o esperado para a idade gestacional; o peso das supra-renais  
184 foi menor nos casos com Malformação Congênita e Imaturidade Pulmonar  
185 (Tabela 7).  
186

186 Tabela 7. Comparação do peso dos órgãos de acordo com a idade gestacional  
 187 entre os grupos de causas de morte nas autopsias perinatais.  
 188

Grupos	n (%)	Idade Gestacional (semanas) X ± DP	Peso do Órgão (gramas) X ± DP	PE (gramas)	♦p
Peso do encéfalo					
MC	12 (16,9)	34,3 ± 3,3	258,2 ± 108,1	246	>0,05
HAP	37 (52,1)	32,2 ± 5,6	277,8 ± 214,9	209	>0,05
IA	14 (19,8)	31,1 ± 7,1	185,6 ± 131,7	187,5	>0,05
Miscelânea	3 (4,2)	34,3 ± 7,1	272,0 ± 47,0	246	>0,05
Membrana Hialina	2 (2,8)	26,0 ± 5,7	260,0 ± 268,7	111	>0,05
Imaturidade Pulmonar	2 (2,8)	23,5 ± 2,1	78,0 ± 7,8	76,5	>0,05
Isoimunização	1 (1,4)	26,0	150,0	111	NR
♦♦Total	71 (100)				
Peso do fígado					
MC	16 (17,2)	33,8 ± 2,9	83,5 ± 25,5	74	>0,05
HAP	47 (50,4)	31,7 ± 6,2	76,6 ± 61,8	65	>0,05
IA	22 (23,6)	31,3 ± 6,2	70,9 ± 45,9	59	>0,05
Miscelânea	3 (3,3)	34,3 ± 7,1	78,5 ± 37,7	74	>0,05
Membrana Hialina	2 (2,2)	26,0 ± 5,7	53,2 ± 48,4	39	>0,05
Imaturidade Pulmonar	2 (2,2)	23,5 ± 2,1	31,7 ± 9,2	32	>0,05
Isoimunização	1 (1,1)	26,0	118,0	39	NR
♦♦Total	93 (100)				
Peso dos pulmões					
MC	13 (13,7)	33,8 ± 2,9	22,0 ± 9,5	40	<0,05
HAP	51 (53,6)	31,9 ± 5,9	48,3 ± 89,1	34	>0,05
IA	22 (23,1)	31,7 ± 6,4	36,6 ± 22,6	11	<0,05
Membrana Hialina	3 (3,2)	27,3 ± 4,6	24,4 ± 6,3	20,5	>0,05
Miscelânea	3 (3,2)	34,3 ± 7,1	28,6 ± 5,7	40	>0,05
Imaturidade Pulmonar	2 (2,1)	21,0 ± 1,4	9,0 ± 5,2	11	>0,05
Isoimunização	1 (1,1)	26,0	14,0	18	NR
♦♦Total	95 (100)				
Peso do coração					
MC	12 (12,9)	33,5 ± 3,0	13,6 ± 7,7	13,4	>0,05
HAP	51 (54,8)	32,2 ± 6,0	12,6 ± 7,8	11	>0,05
IA	22 (23,7)	31,9 ± 6,2	11,9 ± 7,9	11	>0,05
Membrana Hialina	3 (3,2)	27,3 ± 4,6	5,4 ± 2,3	7	>0,05
Miscelânea	3 (3,2)	34,3 ± 7,1	12,1 ± 3,1	13,4	>0,05
Imaturidade Pulmonar	1 (1,1)	22,0	3,0	3,4	NR
Isoimunização	1 (1,1)	26,0	18,8	6,4	NR
♦♦Total	93 (100)				

			Peso do baço		
MC	15 (16,3)	34,1 ± 2,7	6,9 ± 5,3	5,9	>0,05
HAP	48 (52,1)	31,6 ± 6,1	10,8 ± 25,0	4,1	>0,05
IA	21 (22,8)	31,4 ± 6,1	8,6 ± 8,9	3,75	<0,05
Miscelânea	3 (3,3)	34,3 ± 7,1	7,8 ± 2,3	5,2	>0,05
Membrana Hialina	2 (2,2)	26,0 ± 5,7	2,7 ± 2,6	2,2	>0,05
Imaturidade Pulmonar	2 (2,2)	23,5 ± 2,1	0,4 ± 0,1	1,7	<0,05
Isoimunização	1 (1,1)	26,0	50,0	2,2	NR
◆◆Total	92 (100)				
			Peso do Timo		
MC	18 (22,5)	34,8 ± 2,6	8,3 ± 5,3	7,8	>0,05
HAP	36 (45)	31,8 ± 6,0	5,8 ± 4,4	5,5	>0,05
IA	18 (22,5)	29,9 ± 6,1	4,1 ± 3,1	4,6	>0,05
Membrana Hialina	3 (3,8)	27,3 ± 4,6	2,5 ± 1,3	3,4	>0,05
Miscelânea	3 (3,8)	34,3 ± 7,1	3,7 ± 1,2	7,5	<0,05
Imaturidade Pulmonar	1 (1,2)	25,0	0,8	2,8	NR
Isoimunização	1 (1,2)	26,0	0,5	3,0	NR
◆◆Total	80 (100)				
			Peso das Supra-renais		
MC	11 (16,2)	33,6 ± 2,6	3,9 ± 2,1	5,5	<0,05
HAP	36 (52,9)	30,5 ± 6,1	3,9 ± 2,7	4,2	>0,05
IA	16 (23,6)	31,3 ± 6,3	5,0 ± 4,5	4,2	>0,05
Imaturidade Pulmonar	2 (2,9)	23,5 ± 2,1	1,9 ± 0,1	2,9	<0,05
Miscelânea	2 (2,9)	30,5 ± 3,5	4,2 ± 0,4	4,2	>0,05
Membrana Hialina	1 (1,5)	22,0	2,3		NR
◆◆Total	68 (100)				

189 ◆"t" de Student para uma média. NR: Não realizado. PE: Peso Esperado para  
 190 população. ◆◆ Total de casos em que o peso de cada órgão foi avaliado. MC:  
 191 Malformação Congênita; HAP: Hipóxia/Anóxia Perinatal; IA: Infecção  
 192 Ascendente.  
 193

193 *Discussão*

194 Durante os anos de 1990 a 2005 foram realizadas 467 autópsias, sendo  
195 41,8% da faixa etária perinatal. Estes dados demonstram uma alta frequência  
196 das autópsias realizadas no período perinatal, estando de acordo com o  
197 demonstrado na literatura, onde as autópsias perinatais apresentam alta  
198 frequência quando comparada às demais faixas etárias (Vujanié e cols. 1995;  
199 1998; Moreira 2007). Em 164 (84,1%) casos de autópsia perinatal a causa de  
200 morte foi estabelecida. Entre os fatores que podem interferir no diagnóstico  
201 anatomopatológico estão a ausência de informações clínicas e a alta frequência  
202 de autópsia na faixa etária perinatal (Horn e cols. 2004).

203 As causas de morte mais frequentes foram a Hipóxia/Anóxia Perinatal, a  
204 Infecção Ascendente e as Malformações Congênitas, dados semelhantes aos de  
205 outros trabalhos (Tasdelen e cols. 1995). Existem várias classificações para a  
206 mortalidade perinatal. As baseadas na causa de morte se associam a uma  
207 grande variação de fatores relacionados diretamente ao feto ou a criança ou  
208 indiretamente a mãe e a placenta. Portanto, muitas variáveis podem ser  
209 associadas a uma única causa (Wigglesworth 1994). Como o estudo foi  
210 realizado em crianças autopsiadas, muitas vezes o acesso ao corpo e as  
211 informações clínicas restritas são as fontes de informação sobre a causa de  
212 morte. Embora a consulta dos prontuários médicos tenha sido feita, muitos se  
213 perderam no serviço, prejudicando a associação dos achados morfológicos com a  
214 clínica materna e fetal.

215 Os casos de Hipóxia/Anóxia Perinatal foram predominantes de 1990 a  
216 2006, e houve aumento dos casos com Infecção Ascendente e Malformação



217 Congênita. Estes tipos de causa de morte estão entre os principais descritos na  
218 literatura para faixa etária perinatal (Peres 2006; Ngoc e cols. 2006). Outros  
219 fatores podem ter contribuído para o aumento do diagnóstico de causas de  
220 morte por infecção ascendente, principalmente pela atenção destinada ao  
221 exame placentário em nosso serviço, principalmente nos últimos anos. Em  
222 relação às malformações congênitas, o melhor entendimento dos fenômenos  
223 relacionados ao desenvolvimento intra-uterino, através da análise clínica e das  
224 autópsias no período perinatal (Gordijn e cols. 2002), pode ter contribuído para  
225 melhor estabelecer os diagnósticos de malformação congênita.

226 Nos casos com Hipóxia/Anóxia Perinatal e Infecção Ascendente, a  
227 natimortalidade foi mais freqüente. A prematuridade foi mais freqüente em  
228 todos os grupos, embora os casos com Malformações Congênitas tenham  
229 apresentado idade gestacional significativamente maior. A prematuridade e a  
230 restrição de crescimento intra-uterino estão entre as principais causas de  
231 morte perinatal (Yamauchi e cols. 1999). A maior idade gestacional nos casos  
232 com Malformações Congênitas pode ter favorecido a sobrevivência pós-natal,  
233 enquanto nos casos com Infecção Ascendente e Hipóxia/Anóxia Perinatal, a  
234 prematuridade e suas complicações podem ter contribuído para complicações e  
235 morte num período de tempo menor.

236 A autólise foi observada em 70 (42,7%) dos casos, sendo mais freqüente  
237 no grupo de Hipóxia/Anóxia Perinatal, e menos freqüente no de Malformações  
238 Congênitas. Estudos demonstram uma freqüência de 51% de fetos macerados,  
239 semelhante ao encontrado neste trabalho. Nos casos com autólise o peso dos  
240 órgãos diminui, sendo mais alterados o fígado, o timo e o baço. O peso corporal

241 não é afetado nos casos de autólise, embora ela possa interferir nos valores do  
242 perímetro cefálico e no comprimento do corpo. Em nossos dados a autólise não  
243 foi avaliada em relação à intensidade, não sendo possível separar os casos em  
244 que as alterações nos parâmetros corporais possam ter ocorrido pela maior  
245 intensidade da autólise, já que estudos demonstram que a análise separada  
246 dos parâmetros corporais em relação à autólise deve ser realizada somente  
247 quando ela é moderada ou acentuada (Maroun e Graem 2005).

248 Comparando o peso dos órgãos em relação à autólise, o baço apresentou  
249 peso significativamente maior quando comparado com os casos não macerados.  
250 Estudos demonstram que entre os órgãos internos, o fígado é o órgão que  
251 apresenta maior variação do peso, diminuindo de 30 a 50% nos casos de  
252 autólise acentuada. Essa redução também pode ser observada no baço e no  
253 timo de forma menos acentuada, e pouca variação é encontrada em órgãos  
254 como o coração e o cérebro (Maroun e Graem 2005). Em relação à autólise,  
255 somente o baço apresentou alteração do peso. Em nossos dados o peso do baço  
256 foi maior nos casos que apresentaram Infecção Ascendente, onde  
257 freqüentemente são observadas alterações como a esplenomegalia, podendo ser  
258 essa a causa do aumento do peso observado neste órgão.

259 O peso das crianças com Hipóxia/Anóxia Perinatal, Membrana Hialina e  
260 Infecção Ascendente foi maior do que o esperado para a população. Para  
261 interpretar a morte perinatal devem ser levados em consideração outros  
262 fatores além do peso de nascimento e da idade gestacional (Hey, Lloyd e  
263 Wigglesworth 1986), devido a influencia de outras características como as

264 genéticas e socioeconômicas (Alexander e cols. 2003), parâmetros que não  
265 foram avaliadas no presente estudo.

266 O peso dos pulmões foi maior nos casos com Infecção Ascendente e  
267 menor nos casos com Malformação Congênita. Nos casos de Infecção  
268 Ascendente o infiltrado inflamatório pode contribuir para o aumento do peso  
269 pulmonar (Hey, Lloyd e Wigglesworth 1986). Nas Malformações Congênicas, a  
270 maioria foi relacionada a alterações renais, que geralmente são associadas a  
271 hipoplasia pulmonar, contribuindo para redução do peso. A incidência de  
272 malformações é 12,8% nos casos de morte neonatal (Swain, Agrawal e Bhatia  
273 1994), com destaque para as malformações do sistema nervoso central (Eric e  
274 cols. 2003). Outros estudos demonstram que as malformações viscerais podem  
275 ocorrer em cerca de 40% das autópsias, sendo mais comuns as malformações  
276 urológicas, seguidas pelas cardíacas (Mohan, Bhardwaj e Bal 2004).

277 Outros órgãos apresentaram variação do peso, como o timo que  
278 apresentou peso reduzido nos casos classificados como miscelânea. Nestes  
279 casos não se pode estabelecer a causa exata da variação do peso do timo, pois  
280 neste grupo foram classificados fetos ou neonatos com diferentes tipos de  
281 intercorrências, além de ter sido observada uma baixa casuística.

282 Diferentes causas de morte podem influenciar nos parâmetros  
283 antropométricos nas autópsias pediátricas realizadas no período perinatal  
284 (Maroun e Graem 2005). Portanto, a análise dos diferentes parâmetros  
285 antropométricos pode contribuir para melhorar a interpretação dos achados de  
286 autópsia e a sua relação anatomoclínica.

1            *Objetivo II. Comparar entre os tipos de causa de morte as alterações morfológicas das*  
2    *supra-renais coletadas das autópsias perinatais*

3

4            ***Introdução***

5            O crescimento da supra-renal é caracterizado por ser rápido, com a alta  
6            atividade esteroidogênica e aspecto morfológico único, composto por duas zonas  
7            morfolologicamente distintas: a córtex definitiva e a córtex fetal. A córtex  
8            definitiva é responsável pela produção de cortisol, importante para o controle  
9            da homeostase intra-uterina e a maturação dos órgãos fetais, sendo composta  
10           por um aglomerado de células basofílicas, com características típicas de células  
11           no estado proliferativo, como citoplasma aumentado contendo ribossomos  
12           livres, originando no final da gestação a zona glomerulosa. Na zona de  
13           transição as células possuem características intermediárias, podendo sintetizar  
14           cortisol após a metade da gestação, e originam a zona fasciculada após 30  
15           semanas de gestação (Mesiano e Jaffe 1997).

16           Entre 16 e 20 semanas a maior parte da supra-renal é ocupada pela  
17           córtex fetal, composta por uma ampla camada de células eosinofílicas, em  
18           alguns locais mais espaçadas e com muitos sinusóides, exibindo características  
19           ultraestruturais típicas de células secretoras de esteróides (Delprado e Baird  
20           1984a, b). A córtex fetal é o sítio primário de crescimento e produção de  
21           esteróides, produzindo *sulfato de dehydroepiandrosterona* que é então  
22           conjugado pela placenta e transformado em estrogênio e progesterona. Uma  
23           parte da progesterona retorna à supra-renal, sendo convertida em  
24           glicocorticóides pela córtex definitiva (Delprado e Baird 1984b).

25           Variações na morfologia e no desenvolvimento da supra-renal são  
26 reconhecidas há muitos anos, mas somente a partir de 1969 estas alterações  
27 foram relacionadas ao *stress* intra-uterino (Oppenheimer 1969; Pohujani e  
28 cols. 1969a, b). O *stress* pode ser definido como uma condição desfavorável para  
29 o feto que estimula sua produção de ACTH. Conseqüentemente há aumento da  
30 produção de cortisol, também chamado “hormônio do *stress*“, secretado em  
31 altos níveis e relacionado a alterações produzidas pelo *stress* (Delprado e Baird  
32 1984b). Estudos demonstram a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-supra-  
33 renal em resposta a estímulos nocivos agudos intra-uterinos como a hipóxia  
34 aguda, as hemorragias, e o aumento de insulina induzindo hipoglicemia,  
35 embora pouco se conheça sobre os mecanismos crônicos do *stress* (Butler e cols.  
36 2002).

37           Em condições de *stress* o feto tem uma tendência a controlar a acidose  
38 metabólica pelo consumo de ácido láctico e síntese de lipídeos (Sakamoto e cols.  
39 1977). Algumas alterações relacionadas ao *stress* são descritas na supra-renal  
40 como uma maior coloração amarelada por acúmulo de lipídeos na córtex fetal,  
41 sendo associada a doenças metabólicas, incompatibilidade do sistema RH,  
42 infecções, e longo período de morte intra-uterina (Bendon  
43 e Coventry 2004). Estudos propõem uma graduação para a disposição de  
44 lipídeos na supra-renal sendo associada a alterações na placenta e a dados  
45 clínicos sobre a causa de morte intra-uterina. Na córtex fetal, o padrão de  
46 distribuição lipídica é dividido em tipo I, com lipídeos acumulados próximos a  
47 veia central da supra renal, associado ao *stress* agudo; o tipo II, com lipídeos  
48 dispostos além do espaço periférico à veia central, associado a um maior tempo

49 de retenção intra-uterina após a morte; e o tipo III, com lipídeos acumulados  
50 em toda córtex fetal, associado à *stress* fetal crônico (Becker e Becker 1976).

51 Como o papel da supra-renal na reposta fetal ao *stress* tem sido motivo  
52 de várias publicações a avaliação objetiva da vacuolização da supra-renal  
53 levaria a uma melhor interpretação dos achados da autópsia pediátrica  
54 melhorando a relação com os dados clínicos e laboratoriais.

55

55 *Material e métodos*

56 Dos 148 casos com causa de morte por malformações congênitas,  
57 Hipóxia/Anóxia Perinatal e Infecção Ascendente selecionados para a análise  
58 morfológica, foram excluídos os casos com autólise grave, e os casos sem  
59 lâminas, blocos e fragmentos nas reservas disponíveis nos arquivos da  
60 Disciplina de Patologia Geral, sendo selecionados ao final 95 casos, sendo feita  
61 uma análise unilateral da supra-renal (Anexo IV).

62 No exame macroscópico as supra-renais que foram dissecadas, pesadas e  
63 fixadas em formaldeído 10%. Após a inclusão em parafina e a realização de  
64 cortes de cinco  $\mu\text{m}$ , as supra-renais foram coradas pela Hematoxilina e Eosina.  
65 As áreas de vacuolização foram divididas em: tipo I, com lipídeos acumulados  
66 próximos à veia central da supra-renal; o tipo II, com lipídeos dispostos além  
67 do espaço periférico à veia central e com no máximo um vacúolo por célula; e o  
68 tipo III, com lipídeos acumulados até a córtex fetal, com mais de um vacúolo  
69 por célula (Adaptado – Becker e Becker 1976). Os casos com supra-renal  
70 disponível nos vidros de reserva das autópsias foram congelados e processados  
71 para coloração pelo Sudam III, para confirmar a natureza da substância  
72 acumulada no interior dos vacúolos, sendo avaliados dez casos por grupo.

73 As variáveis foram testadas para verificar o tipo de distribuição através  
74 do teste de Kolmogorov-Smirnov e análise das variâncias. Em casos de  
75 distribuição normal e variâncias semelhantes, foi utilizado o teste ANOVA (F)  
76 para comparação entre os três grupos, seguido do teste de Bonferroni, quando  
77 necessário. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão ( $X \pm DP$ ).  
78 Quando a distribuição não foi normal, ou quando ela foi normal e com

79 variâncias não semelhantes, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-  
80 Wallis (H) na comparação entre os três grupos, seguido pelo teste de Dunn  
81 quando necessário. Os resultados foram expressos em mediana, e valores  
82 correspondentes a 25% e 75% (Med – 25%-75%). Foram consideradas  
83 estatisticamente significativas as diferenças em que o nível de significância foi  
84 menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

85



**Resultados**

Das 95 supra-renais avaliadas, o padrão tipo I de vacuolização foi observado em 50 (52,6%) casos, 21 (22,1%) apresentaram o tipo II e 24 (25,3%) o tipo III. As supra-renais recuperadas nos vidros de reserva e coradas pelo Sudam III apresentaram marcação positiva (Objetivo II; Figura 1).

A média da idade gestacional foi de 32,6±5,5 semanas nos grupos com padrão discreto, 31,7±6 no moderado e de 33,5±4,9 semanas nos casos com padrão de vacuolização acentuado, sem diferença significativa entre os grupos. O grau de vacuolização foi maior nos casos com Infecção Ascendente (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência do grau de vacuolização da supra-renal entre os grupos de causas de morte diagnosticadas nas autópsias perinatais.

Grupos	n (%)	Idade Gestacional (semanas)			Grau de vacuolização		
		Mediana	25%	75%	Mediana	25%	75%
MC	20 (21,1)	35,0	32,5	36,0	1,0	1,0	1,0
HAP	57 (60,0)	33,0	29,0	38,0	2,0	1,0	3,0
IA	18 (18,9)	31,0	25,0	36,0	1,0	1,0	2,0
Total	95 (100)						
Testes		H = 2,461; p = 0, 292			*H = 9,657; p = 0, 008		

\*Dunn: Malformação Congênita e Infecção Ascendente – p< 0,05. MC: Malformação Congênita; HAP: Hipóxia/Anóxia Perinatal; IA: Infecção Ascendente.

101 Nos prematuros os casos com Hipóxia/Anóxia Perinatal apresentaram  
 102 diferença significativamente maior em relação aos casos com Malformações  
 103 Congênicas (Tabela 2).

104 Tabela 2. Frequência do grau de vacuolização da supra-renal entre os grupos  
 105 de causas de morte por Hipóxia/Anóxia Perinatal, Malformação Congênita e  
 106 Infecção Ascendente, diagnosticadas nas autópsias perinatais, separando fetos  
 107 ou neonatos a termo e prematuros.  
 108  
 109

Grupos		n (%)	Idade Gestacional (semanas) X ± DP	Grau de vacuolização		
				Mediana	25%	75%
Termo	MC	3 (3,2)	37,3 ± 0,6	1,0	1,0	1,0
	HAP	19 (20,0)	38,9 ± 1,3	2,0	1,0	3,0
	IA	4 (4,2)	38,8 ± 2,9	2,0	1,5	2,5
			F= 1,301; p= 0,292	H= 3,745; p= 0,154		
Prematuros	MC	17 (17,9)	33,6 ± 2,2	1,0	1,0	1,3
	HAP	38 (40,0)	29,4 ± 4,5	2,0	1,0	3,0
	IA	14 (14,7)	28,8 ± 4,8	1,0	1,0	2,0
Total		95 (100)				
Testes			*F= 7,438; p= 0,001	**H= 6,578; p= 0,037		

110 Prematuros: \*Bonferroni: MC x IA; MC x HAP - p< 0,05. \*\*Dunn: MC x HAP  
 111 - p< 0,05. MC: Malformação Congênita; HAP: Hipóxia/Anóxia Perinatal; IA:  
 112 Infecção Ascendente.  
 113

113 *Discussão*

114 A maturação da córtex fetal da supra renal não acontece antes das 23  
115 semanas de gestação para a produção de cortisol. Quando ocorre uma  
116 intercorrência gestacional que leva a morte prematura, ocorre  
117 amadurecimento precoce do sistema enzimático levando a alta produção de  
118 corticóide fetal intra-uterino (Watterberg 2004). A vacuolização observada  
119 nesses casos parece refletir a hiperatividade glandular para produção  
120 hormonal. O eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal é hábil para responder ao  
121 *stress* com o aumento da produção de cortisol (Mesiano e Jaffe 1997). A  
122 produção de glicocorticóides também depende da interação entre a produção de  
123 esteróide androgênico C19, *sulfato de dehydroepiandrosterona*, que servem  
124 como substrato para produção de estrogênio e progesterona pela placenta.  
125 Estes hormônios retornam à supra-renal e são usados para a produção de  
126 cortisol pela córtex definitiva, utilizando o colesterol como substrato (Delprado  
127 e Baird 1984b). Como a histoquímica provou a natureza lipídica do material  
128 acumulado este provavelmente é colesterol que servirá de substrato para a  
129 produção de corticóide.

130 O padrão com maior grau de vacuolização da córtex fetal geralmente é  
131 encontrado nas gestações a termo. A corticotrofina tende a aumentar durante a  
132 gestação, indicando a maturidade fetal (Smith e cols. 1998). Estudos  
133 experimentais em ratas demonstram o aumento de cortisol entre 19 e 20 dias  
134 de gestação pela supra-renal fetal, funcionando como um mecanismo  
135 adaptativo ao *stress* do parto (Sakamoto e cols. 1977; Pike 2005). No presente  
136 estudo, o maior grau de vacuolização foi encontrado nos prematuros, como

137 resposta fetal ao *stress*, que causou a morte fetal, em nossos casos provocada  
138 pela Hipóxia/Anóxia Perinatal e pela Infecção Ascendente.

139 O padrão grosseiro de vacuolização lipídica é relacionado a hipóxia fetal  
140 provocada por distúrbios circulatórios provocados por baixo fluxo placentário  
141 (Becker e Becker 1976). Outros afirmam que o tipo I é associado à história  
142 clínica e alterações placentárias compatíveis com rápida morte fetal, e os tipos  
143 II e III representam diferentes graus de um mesmo processo patológico  
144 (Delprado e Baird 1984b). Estudos experimentais demonstram que quanto  
145 mais cedo acontecem condições adversas responsáveis pelo *stress* intra-uterino,  
146 maior são as chances de uma reprogramação do eixo hipotálamo-hipófise-  
147 adenal, com secreção aumentada e contínua de ACTH, mesmo que as condições  
148 de *stress* sejam mantidas por pouco tempo durante a gestação (Butler e cols.  
149 2002). Estes dados indicam que não o tempo contínuo de hipóxia, mas o  
150 estágio do desenvolvimento em que o *stress* intra-uterino ocorre, é quem  
151 determina a reprogramação do eixo hipotálamo – hipófise – supra-renal, com  
152 aumento de ACTH e como conseqüência morfológica a maior vacuolização da  
153 supra-renal, como observado neste estudo.

154 No presente estudo houve uma maior vacuolização nos casos com  
155 Infecção Ascendente. O fator primário para o aumento de atividade de  
156 produção fetal de cortisol é a corioamnionite, por gerar citocinas pró-  
157 inflamatórias que estimulam o eixo hipotálamo-supra-renal fetal. A  
158 manutenção dos altos níveis de corticóide em resposta a estímulos  
159 inflamatórios ocorre pela ativação da produção do hormônio placentário de

160 liberação de corticotrofina, que não responde ao feedback negativo causado  
161 pela alta concentração de cortisol no sangue fetal (Watterberg 2004).

162 Com a melhora da assistência perinatal e a sobrevivência dos  
163 prematuros expostos a estímulos como hipóxia e Infecção Ascendente, a  
164 descrição das lesões morfológicas da supra-renal nesses fetos e sua relação com  
165 a causa de morte podem ajudar nos futuros estudos relacionados aos fetos  
166 expostos ao *stress* intra-uterino, e na prevenção das doenças relacionadas a  
167 hiperatividade da supra-renal.

1 *Objetivo III. Comparar entre os tipos de causa de morte as alterações morfológicas*  
2 *localizadas no timo coletado das autópsias perinatais.*

3  
4 *Introdução*

5 O timo se desenvolve a partir da terceira bolsa faríngea após seis  
6 semanas de gestação. Com a evolução da gestação existem mudanças no seu  
7 aspecto histológico. Inicialmente existe predomínio de células epiteliais. No  
8 final do segundo trimestre há intensa infiltração de linfócitos originando duas  
9 porções bem delimitadas, a córtex e a medular (Wigglesworth 1996). Além de  
10 células epiteliais e linfócitos, o timo contém uma grande quantidade de  
11 macrófagos, que são distribuídos de maneira randomizada na córtex e na  
12 medula. Possuem a capacidade de ligação a linfócitos tímicos, induzindo sua  
13 maturação, e em alguns casos limitam esta população de células por fagocitose  
14 (Wood 1985).

15 O timo pode sofrer dois tipos de involução, uma idade dependente, e  
16 outra em resposta ao *stress* (Toti e cols. 2000). Estudos através de exame  
17 radiográfico imediatamente após o parto demonstram que a medida do timo é  
18 reduzida nos prematuros com corioamnionite subclínica, quando comparada  
19 com crianças da mesma idade gestacional sem corioamnionite (De Felipe e cols.  
20 1999). Outras intercorrências fetais como Hipóxia/Anóxia Perinatal podem  
21 também levar à involução tímica (Varas e cols. 2000).

22 A involução parece ser mediada pela atuação do eixo hipotálamo-  
23 hipófise-supra-renal, devido à secreção de glicocorticóides que possuem efeito  
24 timolítico, promovendo apoptose dos timócitos da cortical (Cowan e Soreson  
Corrêa RRM. Análise morfológica dos órgãos de stress de autópsias perinatais. Tese de Doutorado, UFTM, 2007.

25 1964; Glavina-Durdov e cols. 2003). No *stress* agudo, o timo apresenta  
26 cariorrexe dos linfócitos, com ativa fagocitose por macrófagos, conferindo o  
27 aspecto de “céu estrelado” na cortical. Se o estímulo persiste, a córtex reduz o  
28 seu tamanho, invertendo a relação de tamanho corticomedular (Toti e cols.  
29 2000). São caracterizados cinco graus histológicos, de acordo com a observação  
30 do número de macrófagos na córtex, aumento do interstício interlobular e com  
31 linfodepleção da córtex, relacionados significativamente com a duração da  
32 doença, achados que ajudam o patologista a estimar a duração da doença antes  
33 do óbito (Van Baarlen, Schuurman e Huber 1988).

34 Os parâmetros utilizados para quantificar a alteração morfológica no  
35 timo são subjetivos e dependem do treinamento e experiência do observador  
36 para associação com as causas de morte. O estudo morfométrico do timo tem  
37 como objetivo o estabelecimento de parâmetros objetivos para a análise do  
38 número de macrófagos e a relação com a causa de morte. A hipótese deste  
39 estudo é de que o número de macrófagos no timo é um parâmetro morfológico  
40 indicativo da intercorrência que levou à morte intra-uterina.

41

41 *Material e métodos*

42 Dos 148 casos com causa de morte por Malformações Congênicas,  
43 Hipóxia/Anóxia Perinatal e Infecção Ascendente selecionados para análise  
44 morfológica, foram excluídos os casos com autólise grave ou sem blocos ou  
45 fragmentos de timo nas reservas das autópsias, sendo selecionados ao final 43  
46 casos. Os fragmentos do timo foram fixados em formaldeído 10%, os cortes  
47 emblocados em parafina foram processados para histoquímica corados pela  
48 Hematoxilina & Eosina, e para a imunohistoquímica.

49 Através da coloração pela Hematoxilina & Eosina, o timo foi graduado  
50 em: Grau 0: considerado o estado preservado, com junção corticomedular  
51 distinta, alta densidade de linfócitos, ampla córtex, e lóbulos tímicos separados  
52 por delicados septos de tecido conjuntivo; Grau 1: apresentando o aspecto  
53 inicial em “céu estrelado”, mantendo a separação dos lóbulos tímicos, relativa  
54 proeminência do interstício e dos vasos sanguíneos e discreta redução de  
55 linfócitos na córtex; Grau 2: caracterizado por extensiva linfodepleção, córtex  
56 estreita ou desaparecendo completamente em alguns pontos; há inversão da  
57 relação córtex/medula, com perda da distinção entre essas áreas. Grau 3:  
58 separação dos lóbulos tímicos e proeminência do interstício e dos vasos  
59 sanguíneos (Toti e cols, 2000) (Anexo V).

60 Para a marcação do número de macrófagos foi utilizado o anticorpo anti  
61 CD68 (DAKO®) na técnica de peroxidase antiperoxidase (Anexo VI). A  
62 quantificação do número de macrófagos imunomarcados foi realizada através  
63 do *software* de morfometria “*KS 300 – Carl Zeiss*”, utilizando o aumento de 800  
64 vezes. Os macrófagos foram contados um a um e seu número estimado em 40



65 campos por lâmina. A determinação do número de campos foi realizada através  
66 do Método da Média Acumulada (Williams 1977).

67 A graduação do timo e a análise morfométrica do número de macrófagos  
68 foram realizadas por observadores diferentes, buscando minimizar a  
69 subjetividade do observador e verificar a variabilidade entre os observadores e  
70 as técnicas utilizadas.

71 As variáveis foram testadas para verificar o tipo de distribuição através  
72 do teste de Kolmogorov-Smirnov e análise das variâncias. Em casos de  
73 distribuição normal e variâncias semelhantes, foi utilizado o teste ANOVA (F)  
74 para comparação entre os três grupos, seguido do teste Bonferroni, quando  
75 necessário. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão ( $X \pm DP$ ).  
76 Quando a distribuição não foi normal, ou quando ela foi normal e com  
77 variâncias não semelhantes, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-  
78 Wallis (H) na comparação entre os três grupos, seguido pelo teste de Dunn  
79 quando necessário. Os resultados foram expressos em mediana e valores  
80 correspondentes a 25% e 75% (Med – 25%-75%). Foram consideradas  
81 estatisticamente significativas as diferenças em que o nível de significância foi  
82 menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

83

83 **Resultados**

84 Dos 43 casos, 17 (39,5%) apresentaram Malformações Congênitas, 15  
85 (34,9%) Hipóxia/Anóxia Perinatal e 11 (25,6%) Infecção Ascendente. Não houve  
86 diferença significativa da idade gestacional e do peso do timo entre os grupos  
87 de causa de morte (Tabela 1).

88

89 Tabela 1. Análise da idade gestacional e do peso do timo nos casos com timo  
90 avaliado entre os grupos de causas de morte classificados como Infecção  
91 Ascendente, Malformação Congênita e Hipóxia/Anóxia Perinatal nas autópsias  
92 perinatais.

93

Grupos	n (%)	Idade Gestacional (semanas)			Peso do Timo (gramas)
		Mediana	25%	75%	X ± DP
MC	17 (39,5)	35,0	32,8	36,3	11,4 ± 2,8
HAP	15 (34,9)	32,0	23,8	39,0	12,1 ± 2,6
IA	11 (25,6)	35,0	28,0	37,0	11,5 ± 4,5
Total	43 (100)				
Testes		H = 0,346; p = 0,841			F = 0,166; p = 0,848

94 MC: Malformação Congênita; HAP: Hipóxia/Anóxia Perinatal; IA: Infecção  
95 Ascendente.

96

96 Em relação ao grau de *stress*, o mais freqüente foi Grau 0 com 15  
 97 (34,9%), seguido pelo Grau 1 com 17 (39,5%), o Grau 2 com 10 (23,3%) e 1  
 98 (2,3%) caso com o Grau 3 (Objetivo III; Figura 1). O Grau 3 apresentou maior  
 99 número de macrófagos (Tabela 2). Os maiores graus de *stress* no timo foram  
 100 observados nos casos com Hipóxia/Anóxia Perinatal e Infecção Ascendente O  
 101 número de macrófagos foi significativamente maior nos casos com  
 102 Hipóxia/Anóxia Perinatal, quando comparados aos demais grupos (Tabela 3).

103

104 Tabela 2. Análise do número de macrófagos em relação ao grau de *stress* no  
 105 timo das autópsias perinatais.

106

Grau de <i>stress</i>	n (%)	Número de macrófagos		
		Mediana	25%	75%
0	15 (34,9)	12,0	9,0	14,0
1	17 (39,5)	12,0	10,0	15,0
2	10 (23,3)	12,0	9,0	14,0
3	1 (2,3)	17,5	14,0	19,0
Total	43 (100)			
Teste		*H = 25,801; p< 0,001		

107

\*Dunn: 3 X 0; 3 X 1; 3 X 2, p< 0,05

108

109

110 Tabela 3. Análise do número de macrófagos e do grau de *stress* no timo entre  
 111 as causas de morte diagnosticadas nas autópsias perinatais.

112

Grupos	n (%)	Número de macrófagos			Graus de <i>Stress</i>		
		Mediana	25%	75%	Mediana	25%	75%
MC	17 (39,5)	11,0	9,0	14,0	1,0	0,0	1,0
HAP	15 (34,9)	13,0	10,0	16,0	1,0	0,0	1,0
IA	11 (25,6)	12,0	9,0	14,0	1,0	1,0	2,0
Total	43(100)						
Teste		*H = 35,103; p< 0,001			**H = 43,870; p< 0,001		

113

\*Dunn: MC X HAP, p< 0,05. \*\*Dunn: MC X HAP; MC X IA, p< 0,05. MC: Malformação  
 114 Congênita; HAP: Hipóxia/Anóxia Perinatal; IA: Infecção Ascendente.

115

115 Analisando as gestações a termo e os prematuros separadamente, os  
 116 casos com Hipóxia/Anóxia Perinatal apresentaram estatisticamente maior  
 117 número de macrófagos (Tabela 4) (Objetivo III; Figura 2).

118 Tabela 4. Comparação do número de macrófagos no timo entre as gestações a  
 119 termo e os prematuros separando entre as causas de morte por Malformação  
 120 Congênita, Hipóxia/Anóxia Perinatal e Infecção Ascendente diagnosticadas nas  
 121 autópsias perinatais.  
 122  
 123

Grupos		n (%)	Idade Gestacional (semanas) X ± DP	Número de macrófagos		
				Mediana	25%	75%
Termo	MC	4 (9,3)	37,8 ± 0,9	12,0	9,0	14,0
	HAP	6 (14,0)	39,3 ± 1,6	13,0	10,0	15,0
	IA	4 (9,3)	38,8 ± 2,9	12,0	9,0	15,0
Testes			F= 0,742; p= 0,499	*H= 6,118; p= 0,047		
Prematuros	MC	13 (30,2)	33,2 ± 2,3	11,0	9,0	14,0
	HAP	9 (20,9)	26,9 ± 4,9	13,0	10,0	17,0
	IA	7 (16,3)	29,7 ± 4,5	11,0	9,0	13,0
Total		43 (100)				
Testes			**F= 7,382; p= 0,003.	***H = 26,266; p< 0,001		

124 Termo: \*Bonferroni: MC X HAP, p< 0,05. Prematuro: \*\*Bonferroni: MC x HAP,  
 125 p<0,05. \*\*\*Dunn: MC x HAP, p< 0,05. MC: Malformação Congênita; HAP:  
 126 Hipóxia/Anóxia Perinatal; IA: Infecção Ascendente.  
 127

127 *Discussão*

128           No presente estudo não houve diferença significativa de idade  
129 gestacional entre os grupos de causa de morte dos quais foi avaliado o número  
130 de macrófagos. Estes dados são importantes, pois existem variações na  
131 morfologia do timo de acordo com a idade gestacional (Toti e cols. 2000). Os  
132 fetos prematuros têm maior celularidade, pois apresentam focos de eritropoiese  
133 e esta diferença poderia alterar a análise do número de macrófagos  
134 (Wigglesworth 1996; Toti e cols. 2000). O entendimento dos aspectos  
135 relacionados à idade é importante em relação à quantidade e composição dos  
136 componentes anatômicos para estabelecer as variações morfológicas  
137 relacionadas a doenças (Hale 2002; 2004).

138           O número de macrófagos e o grau de *stress* do timo foram  
139 significativamente maiores nos casos com Hipóxia/Anóxia Perinatal e  
140 Infecção Ascendente. Alguns estudos afirmam que a análise do processo de  
141 involução tímica não possui relação com eventos antes do óbito (Berry 1993).  
142 Outros afirmam que o processo de morte, independente da causa, é associado  
143 ao *stress*. Existe uma variação da morfologia do timo associada com o grau de  
144 *stress*, principalmente relacionada à população de células do órgão. O timo  
145 normal apresenta poucas células positivas para CD68, que são confinadas à  
146 medula. Nos casos de involução, numerosos macrófagos aparecem no espaço  
147 interlobular, intersticial e na córtex. O número também é aumentado na  
148 medula, principalmente na junção corticomedular, associada ao aumento dos  
149 corpúsculos de Hassall (Toti e cols. 2000; Hale 2004). Estes dados estão de  
150 acordo com o presente estudo, onde foi encontrado aumento dos macrófagos

151 em todas as porções, e ainda, alterações na morfologia do timo aumentando  
152 se grau de *stress*.

153 No grupo de malformações congênitas somente foram incluídos os casos  
154 com hipoplasia pulmonar ou malformações do sistema nervoso central cujo  
155 óbito acontece minutos após o nascimento. Nestes casos o estímulo causado  
156 pela hipóxia não perdurou tempo suficiente para ativar o mecanismo de  
157 resposta fetal. Nos casos com Hipóxia/Anóxia Perinatal intra-uterina o tempo  
158 do estímulo nocivo foi acompanhado de um maior número de macrófagos,  
159 indicando que o tempo de hipóxia seria o fator responsável pelo aumento de  
160 macrófagos no timo.

161 Em conclusão, o aumento do número de macrófagos no timo é um  
162 parâmetro morfológico indicativo de hipóxia intra-uterina conseqüente a uma  
163 doença crônica.

1 *Objetivo IV. Comparar entre os tipos de causa de morte as alterações morfológicas*  
2 *localizadas no fígado coletado das autópsias perinatais*

3  
4 *Introdução*

5 O fígado é um importante órgão do sistema metabólico, sofrendo  
6 modificações durante o desenvolvimento (David 1985). No período perinatal o  
7 fígado pode manifestar características de alterações nutricionais,  
8 hematopoiéticas, relacionadas a hipóxia, traumas e doenças metabólicas  
9 (Wigglesworth 1996).

10 Frente à infecção ascendente intra-uterina e a hipóxia, o fígado pode  
11 sofrer alterações funcionais, com prejuízo na produção de enzimas e cofatores  
12 imprescindíveis para o adequado metabolismo e síntese protéica (Ragonesi e  
13 cols. 1997), desenvolvendo alterações como degenerações e morte celular  
14 (Wigglesworth 1996).

15 A interação entre matriz extracelular e células hepáticas é essencial  
16 para homeostase normal e modificações podem resultar em alterações da  
17 função hepática (Martines-Hernandes e Amenta 1993). A morte de células  
18 hepáticas, e como conseqüência à fibrose, pode estar associada às alterações da  
19 hematopoiese extramedular (Andrade 2005). A fibrose é uma condição  
20 caracterizada pelo aumento do estroma conjuntivo de um órgão, decorrente de  
21 cicatrização normal ou exagerada ou de um processo reacional em que a  
22 produção de matriz extracelular não está relacionada com o processo  
23 reparativo. Em conseqüência das modificações na remodelação do órgão e das  
24 alterações na função das células parenquimatosas pela fibrose, podem surgir  
Corrêa RRM. Análise morfológica dos órgãos de stress de autópsias perinatais. Tese de Doutorado, UFTM, 2007.

25 transtornos funcionais importantes nos locais acometidos (Pereira 2004).  
26 Poucos estudos que avaliassem as áreas de fibrose em recém nascidos, sem  
27 relação com anomalias renais foram encontrados na literatura (Nadeev e  
28 Shkurupii 2006).

29 A hematopoiese é definida como a expansão e diferenciação de  
30 precursores hematopoiéticos, ocorrendo na medula óssea, em sinusóides que  
31 invadem a cavidade óssea formada por pequenos osteoclastos após os depósitos  
32 de cálcio na matriz cartilaginosa (Cumano e Godin 2007). O local definitivo de  
33 produção das células sanguíneas na vida pós-natal é a medula óssea. Até que  
34 esta estrutura possua maturidade tecidual para receber os precursores  
35 hematopoiéticos, existe uma hierarquia aparentemente definida dos sítios  
36 hematopoiéticos, entre eles o fígado (Calhoun e cols. 1996; Pahal e cols. 2000;  
37 Tamiolakis e cols. 2003; Cumano e Godin 2007). Durante a fase inicial do  
38 desenvolvimento fetal, o fígado é o principal local responsável pela  
39 hematopoiese, onde podem ser observados dois compartimentos  
40 funcionalmente distintos. No interior dos sinusóides do parênquima acontece a  
41 eritropoiese, enquanto a granulopoiese é restrita ao tecido mesenquimal do  
42 espaço portal (Tamiolakis e cols. 2003; Pfisterer, Faber e Horn 2005). A  
43 eritropoiese extramedular no fígado é caracterizada pelo acúmulo de células  
44 eritropoiéticas que ocupam os sinusóides. O espaço porta contém leucócitos  
45 imaturos e freqüentemente eosinófilos e mielócitos, características que tendem  
46 a desaparecer com o aumento da idade gestacional (Singer 1986).

47 Completando essa hierarquia da hematopoiese fetal, tem-se o timo como  
48 órgão hematopoiético auxiliar, responsável pela maturação de linfócitos e com



49 atividade hematopoiética acessória permanente durante toda vida fetal e pós-  
50 natal. O baço também é um órgão hematopoiético auxiliar atuando até que a  
51 hematopoiese definitiva ocorra na medula óssea (Calhoun e cols. 1996).

52 Na gestação normal ocorre diminuição na contagem eritroblástica e  
53 aumento da concentração de eritrócitos e hemoglobina, indicando queda  
54 progressiva na eritropoiese hepática e elevação da medular. Em casos de  
55 hipóxia fetal observa-se uma relação inversa havendo aumento da eritropoiese  
56 hepática e da contagem eritroblástica (Ragonesi e cols. 1997). Nos casos de  
57 corioamnionite ocorrem graves mudanças que refletem na hematopoiese  
58 extramedular, como a redução da proliferação celular e o aumento nos níveis  
59 de granulopoiese. O aumento de granulopoiese encontrada no fígado fetal pode  
60 contribuir para o diagnóstico de infecção ascendente fetal, principalmente  
61 quando o exame anatomopatológico da placenta não é realizado (Tamiolakis e  
62 cols. 2003).

63 O objetivo do presente estudo foi de quantificar a esteatose, a fibrose e os  
64 focos de eritropoiese extramedular no fígado e relacionar com as causas de  
65 morte. Já que o fígado é um órgão central nas alterações metabólicas sofridas  
66 pelo feto em resposta ao *stress* intra-uterino, nossa hipótese é de que as  
67 alterações morfológicas neste órgão se relacionam com a causa de morte  
68 perinatal.

69

69 *Material e Métodos*

70 Dos 164 casos iniciais foram excluídos os casos com autólise e os que não  
71 foram encontrados lâminas ou blocos nos arquivos. Foram examinados  
72 fragmentos do lobo direito do fígado das crianças autopsiadas. Os cortes  
73 emblocados em parafina foram processados para histoquímica. Foram  
74 realizadas as colorações pela Hematoxilina & Eosina, Sudam III, Perls e Picro-  
75 sírius.

76 Para análise morfológica foi utilizada a coloração pela Hematoxilina &  
77 Eosina, sendo avaliados 69 casos. Foram avaliadas as seguintes alterações:  
78 intensidade da esteatose, porcentagem da fibrose e número de focos de  
79 eritropoiese extramedular no fígado.

80 Para análise da esteatose foi utilizada a coloração pela Hematoxilina &  
81 Eosina. Foram avaliados 69 casos, divididos de acordo com intensidade em:  
82 ausente (Grau 0); discreta (Grau 1), com vacúolos opticamente vazios no  
83 interior de hepatócitos próximos à veia centrolobular, zona III; moderada  
84 (Grau 2), com vacúolos nos hepatócitos das zonas II e III, ocupando o espaço  
85 entre a veia centrolobular e o espaço porta; e acentuada (Grau 3), com vacúolos  
86 nos hepatócitos das zonas I, periportal, II, e III (Brunt 1999) (Anexo VII).

87 Para análise da fibrose foram excluídos os casos com malformações  
88 congênitas renais, e sem lâminas e fragmentos de reserva, sendo obtidos 44  
89 casos (Anexo VIII). A quantificação da fibrose foi realizada na lâmina corada  
90 pelo Picro-sírius examinada sob a luz polarizada, no aumento de 200 vezes. A  
91 determinação do número de campos foi realizada através do Método da Média  
92 Acumulada (Williams 1977). Foram analisados 25 campos por corte, sendo

93 quantificada a fibrose nas três zonas. Foram excluídas as regiões próximas à  
94 cápsula hepática. Os campos para quantificação da fibrose foram capturados  
95 por meio de uma câmara acoplada a um microscópio e a um computador com o  
96 software para análise das imagens, o “*KS 300 – Carl Zeiss*” (Objetivo IV;  
97 Figura 1).

98 Para análise morfométrica das áreas de eritropoiese extramedular, foi  
99 utilizada a coloração pela Hematoxilina e Eosina, sendo avaliados 50 casos.  
100 Foram realizadas dez medidas, em dez campos, no aumento de dez vezes  
101 usando uma ocular integradora de pontos. A quantificação em cada campo foi  
102 feita através da contagem do número de pontos da ocular integradora  
103 coincidentes com o número de focos de eritropoiese extramedular. Para  
104 comprovação dos depósitos de ferro nos focos de eritropoiese foi utilizada a  
105 coloração de Perls (Anexo IX).

106 As variáveis foram testadas para verificar o tipo de distribuição através  
107 do teste de Kolmogorov-Smirnov e análise das variâncias. Em casos de  
108 distribuição normal e variâncias semelhantes, foi utilizado o teste "t" de  
109 Student na comparação entre dois grupos, e o teste ANOVA (F) para a  
110 comparação entre três ou mais grupos. Neste tipo de distribuição, os resultados  
111 foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão ( $X \pm DP$ ). Quando a distribuição  
112 não foi normal, ou quando ela foi normal e com variâncias não semelhantes,  
113 foram utilizados testes não paramétricos: o teste de Mann-Whitney (T) na  
114 comparação entre dois grupos, e o teste de Kruskal-Wallis (H) na comparação  
115 entre três ou mais grupos, seguido pelo teste de Dunn quando necessário.  
116 Neste tipo de distribuição os resultados foram expressos em mediana e valores

117 mínimos e máximos (Med – 25% - 75%). A correlação entre duas variáveis,  
118 apresentando pelo menos uma com distribuição não normal foi analisada pelo  
119 coeficiente de correlação de Spearman (Sr). As proporções foram comparadas  
120 pelo teste do  $\chi^2$ . Foram consideradas estatisticamente significativas as  
121 diferenças em que o nível de significância foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

122

122 **Resultados**

123 Em relação a esteatose, foi ausente em 47 (68,1%), discreta em 10  
 124 (14,5%), moderada em 6 (8,7%) e acentuada em 6 (8,7%) dos casos (Objetivo IV;  
 125 Figura 2). Não houve diferença significativa entre a idade gestacional, o grau  
 126 de esteatose e os tipos de causa de morte (Tabela 1), e em relação à frequência  
 127 de esteatose entre os grupos de causa de morte (Tabela 2).

128

129 Tabela 1. Análise do grau de esteatose entre os diferentes grupos de causa de  
 130 morte diagnosticadas nas autópsias perinatais.

131

Grupos	n (%)	Idade Gestacional (semanas)			Grau de esteatose		
		Mediana	25%	75%	Mediana	25%	75%
MC	25 (36,2)	35,0	31,8	36,0	0,0	0,0	1,0
HAP	28 (40,6)	32,0	26,3	38,0	0,0	0,0	1,0
IA	16 (23,2)	31,0	26,0	36,5	0,0	0,0	1,0
Total	69 (100)						
Testes		H= 2,365; p= 0,307			H= 0,00278; p= 0, 999		

132 MC: Malformação Congênita; HAP: Hipóxia/Anóxia Perinatal; IA: Infecção  
 133 Ascendente.

134

135 Tabela 2. Frequência de esteatose entre os diferentes grupos de causa de morte  
 136 diagnosticadas nas autópsias perinatais.

137

Esteatose	MC	HAP	IA	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Não	17 (68)	18 (66,7)	11 (68,8)	46 (67,6)
Sim	8 (32)	10 (33,3)	5 (31,2)	23 (32,4)
Total	25 (100)	28 (100)	16 (100)	69 (100)
Teste		$\chi^2= 0,0222$ ; p= 0,989		

138 MC: Malformação Congênita; HAP: Hipóxia/Anóxia Perinatal; IA: Infecção  
 139 Ascendente.

140

140 Os prematuros apresentaram menor número de casos com esteatose  
 141 (Tabela 3). A idade gestacional foi maior nos casos esteatose (Tabela 4).

142 Tabela 3. Frequência de esteatose entre termo e prematuro nos diferentes  
 143 grupos de causa de morte diagnosticadas nas autópsias perinatais.  
 144  
 145

Grupos	Sem Esteatose n (%)	Esteatose n (%)	Total n (%)
Termo	8 (17,0)	10 (45,5)	18 (26,1)
Prematuro	39 (83,0)	12 (54,5)	51 (73,9)
Total	47 (100,0)	22 (100)	69 (100)
Teste	$\chi^2= 4,895; p= 0,027$		

146  
 147  
 148 Tabela 4. Análise dos casos com ou sem esteatose separados entre os termo e  
 149 prematuros nas autópsias perinatais.  
 150  
 151

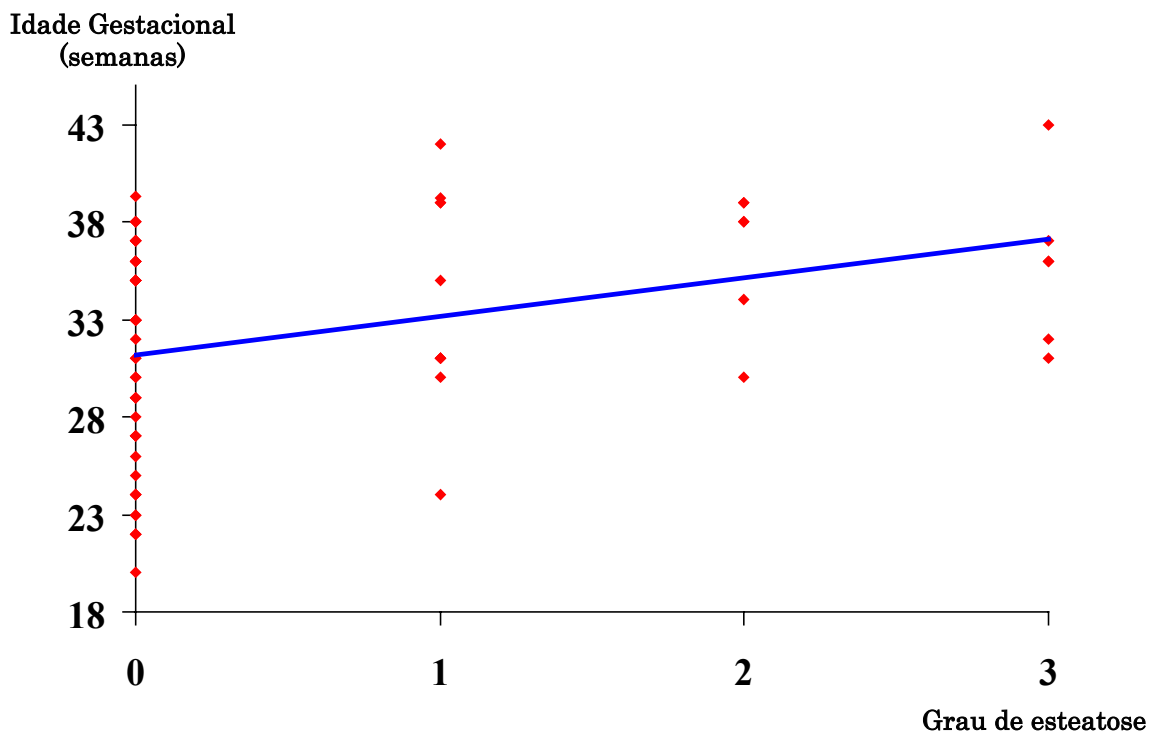
Grupos		n (%)	Idade Gestacional			Testes
			X ± DP			
Prematuro	Sem esteatose	39 (76,5)	29,7 ± 4,9			t = 1,368; p= 0,178
	Com esteatose	12 (23,5)	31,8 ± 3,3			
Total		51 (100)				
			Mediana	25%	75%	
Termo	Sem esteatose	8 (44,4)	37,5	37,0	38,0	T= 52,000; p= 0,037
	Com esteatose	10 (55,6)	39,0	38,0	39,2	
Total		18 (100)				

152

152 Houve correlação positiva e significativa entre o grau de esteatose e a  
153 idade gestacional (Sr: 0,359, p= 0,002) (Figura 3).

154  
155 Figura 3. Correlação entre o grau de esteatose hepática e a idade gestacional  
156 nas autópsias perinatais.

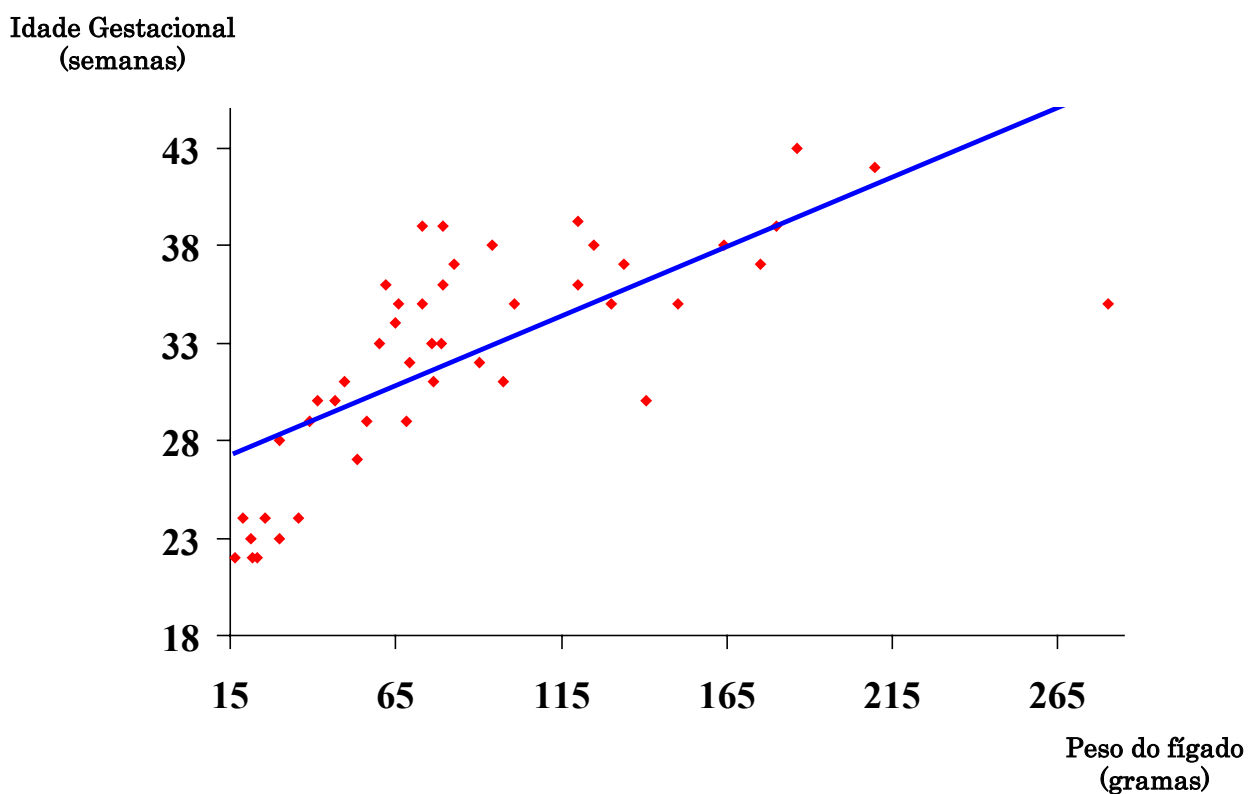
157  
158  
159



160  
161 Coeficiente de correlação - Sr: 0,359, p= 0,002  
162 0: ausente; 1: discreto; 2: moderado; 3: acentuado.  
163

163 Houve correlação positiva e significativa entre o peso do fígado e a idade  
164 gestacional (Sr: 0,812,  $p < 0,001$ ) (Figura 4).

165 Figura 4. Correlação entre o peso do fígado e a idade gestacional nas autópsias  
166 perinatais.



167

168 Coeficiente de correlação - Sr: 0,812,  $p < 0,001$

169



169 Os casos com Hipóxia/Anóxia Perinatal e Infecção Ascendente  
170 apresentaram maior porcentagem de fibrose hepática (Tabela 5). Não houve  
171 diferença significativa da porcentagem de fibrose entre as gestações a termo e  
172 os prematuros (Tabela 6).

173 Tabela 5. Comparação da fibrose entre os grupos de causa de morte nas  
174 autópsias perinatais.  
175

Grupos	n (%)	% de Fibrose		
		Mediana	25%	75%
Malformação Congênita	11 (25,0)	2,0	1,2	4,0
Hipóxia/Anóxia Perinatal	19 (43,2)	2,7	1,5	5,2
Infecção Ascendente	14 (31,8)	2,5	1,4	5,0
Total	44 (100)			
Teste		H = 5,988; p= 0,05		

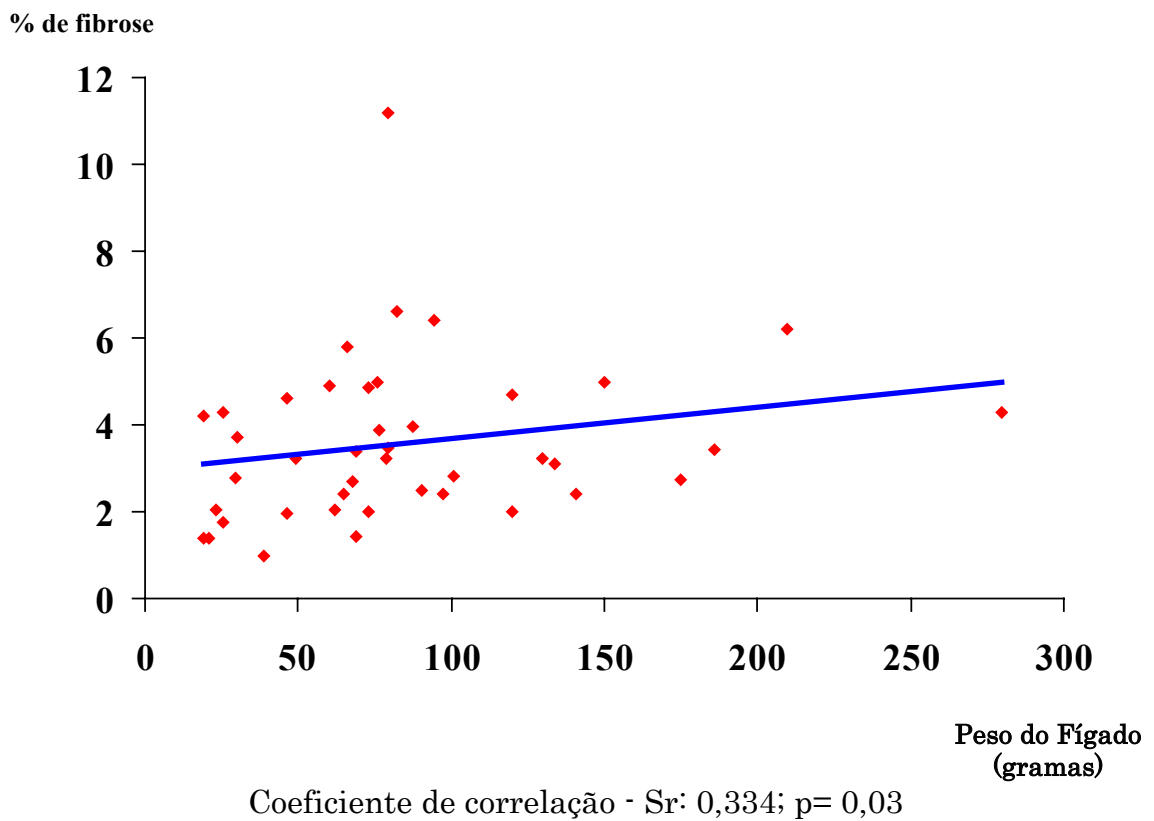
176  
177  
178  
179 Tabela 6. Comparação da fibrose entre as gestações a termo e os prematuros  
180 nas autópsias perinatais.  
181

Grupos	n (%)	% de Fibrose		
		Mediana	25%	75%
Prematuro	33 (75,0)	3,2	2,1	3,9
Termo	11 (25,0)	3,4	2,4	5,8
Total	44 (100)			
Teste		T = 289,000; p= 0,266		

182

Houve correlação positiva e significativa entre o peso do fígado e a porcentagem de fibrose (Figura 5).

Figura 5: Correlação entre a porcentagem da fibrose e o peso do fígado nas autópsias perinatais.



O número de focos de eritropoiese extramedular foi significativamente maior entre os prematuros (Tabela 7) (Objetivo IV; Figura 6). Não houve correlação significativa entre a idade gestacional e o número de focos de eritropoiese ( $Sr: -0,207$ ;  $p= 0,148$ ).

Tabela 7: Comparação do número de focos de eritropoiese extramedular no fígado entre as gestações a termo e prematuros nas autópsias perinatais.

Grupos	n (%)	Número de focos de eritropoiese		
		Mediana	25%	75%
Prematuro	38 (76,0)	2,0	1,0	3,0
Termo	12 (24,0)	1,0	1,0	2,0
Total	50 (100)			
Teste		T= 33539,500; p= 0,012		

Nas gestações a termo o número de focos de eritropoiese foi estatisticamente menor nos casos com infecção, sem diferenças em relação à idade gestacional entre os grupos. Em relação aos prematuros, os casos com asfixia e infecção apresentaram idade gestacional semelhante, no entanto a eritropoiese extramedular foi estatisticamente maior nos casos com infecção (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação do número de focos de eritropoiese extramedular hepática entre os grupos de causas de morte por asfixia, anomalia congênita e infecção, separados em gestações a termo e prematuros das autópsias perinatais.

Grupos		n (%)	Número de focos de eritropoiese Mediana (25% - 75%) ou X ± DP			Idade Gestacional (semanas)		
Termo	MC	3 (6,0)	2,0	1,0	3,0	37,8 ± 0,8		
	HAP	5 (10,0)	2,0	1,0	3,0	39,0 ± 1,3		
	IA	4 (8,0)	1,0	1,0	2,0	39,2 ± 2,7		
			*H= 14,208; p< 0,001			F= 1,440; p= 0,254		
Prematuro	MC	16 (32,0)	2,0	1,0	3,0	33,0	31,0	35,0
	HAP	11 (22,0)	2,0	1,0	2,0	30,0	26,5	31,5
	IA	11 (22,0)	2,0	1,0	3,0	27,0	24,3	34,0
			**H= 13,735; p= 0,001			***H= 8,663; p= 0,013		
Total		50 (100)						

\* Teste de Dunn: MC X IA - p< 0,05. \*\* Teste de Dunn: IA X HAP - p< 0,05. \*\*\*Teste de Dunn: MC X HAP - p< 0,05. MC: Malformação Congênita; HAP: Hipóxia/Anóxia Perinatal; IA: Infecção Ascendente.

### *Discussão*

Em nossos casos não houve diferença significativa da intensidade da esteatose em relação à causa de morte. A esteatose é um processo patológico freqüentemente encontrado em adultos, sendo associada a alterações do metabolismo dos ácidos graxos, condições de hipóxia, desnutrição e o alcoolismo (Hubscher 2006). Em crianças geralmente é relacionado à obesidade, aumento de triglicerídeos, síndrome de resistência à insulina, diabetes e lesão de células hepáticas durante o *stress* oxidativo (Roberts 2003; Nanda 2004). Em recém nascidos pode ser associada à morte súbita, depleção de glicogênio na região periportal em condições de Hipóxia/Anóxia Perinatal; em casos de necrose do parênquima hepático como nas alterações cardiovasculares fetais e neonatais acompanhadas de Hipóxia/Anóxia Perinatal grave, nos erros inatos do metabolismo e na síndrome de *Reye* ou esteatose familiar (Wigglesworth 1996; Rinaldo e cols. 1999) e alterações da fosforilação oxidativa (Fayon e cols. 1992). Portanto, a esteatose foi uma lesão específica de determinadas condições patológicas e não se relaciona de forma geral com a causa da morte perinatal.

No presente estudo a esteatose foi mais freqüente nos fetos a termo e sua intensidade apresentou correlação positiva com a idade gestacional. Não foram encontrados estudos que demonstrassem a variação da vacuolização lipídica de acordo com a idade gestacional em fetos humanos. Em estudos experimentais realizados em ratas a presença de vacúolos lipídicos foi primeiramente evidenciada a partir do 15º dia de idade gestacional e sua quantidade e tamanho aumentou até o final da gestação (Daimon e cols. 1982).

O metabolismo fetal, e conseqüentemente seu crescimento dependem diretamente dos nutrientes que atravessam a placenta. Na gestação, existem adaptações no metabolismo materno, com a finalidade de fornecer substratos suficientes para o desenvolvimento fetal. Um aumento da atividade lipolítica dos adipócitos maternos tem sido observado em gestantes, sendo responsáveis pelo aumento dos ácidos graxos livres durante as últimas semanas de gestação (Benassayag e cols. 1997). No final da gestação haveria síntese de lipídeos pelos tecidos fetais, que associado com a transferência lipídica materna aumentam a oferta de ácidos graxos ao fígado fetal causando o acúmulo nos hepatócitos. No presente estudo os casos com esteatose apresentaram peso do fígado maior sendo este mais um dado associado ao acúmulo de lipídeos nos hepatócitos fetais (Reif e cols. 1993).

Em conclusão o acúmulo citoplasmático de lipídios é uma alteração freqüentemente encontrada em autópsias perinatais a termo, tendo como conseqüência o aumento do peso hepático e não apresentando relação com a causa de morte nos casos avaliados neste estudo.

A porcentagem de fibrose foi maior nos casos com Hipóxia/Anóxia Perinatal e Infecção Ascendente. Na literatura foram encontrados poucos estudos que façam relação entre fibrose hepática e as causas de morte no período perinatal. O aumento da matriz extracelular em fetos com infecção ascendente, hematogênica e hipóxia intra-uterina foi associado à destruição do parênquima hepático, numerosos sítios de hematopoiese extramedular, esclerose do espaço porta e redução do número das células de Kupffer (Nadeev e Shkurupii 2006). No presente estudo a hipóxia perinatal e a ação de citocinas

nos casos com Infecção Ascendente podem ter causado alterações sistêmicas com conseqüente lesão hepática e posterior fibrose (Toti e cols. 2000). Estes dados são importantes, pois embora este estudo tenha sido realizado com material de autópsia, muitas crianças com hipóxia ou infecção ascendentes no período perinatal sobrevivem e no caso de excessiva produção de matriz extracelular no período perinatal a evolução no pós-natal em casos graves pode terminar em cirrose hepática (Lee 2006).

Poucos estudos quantificaram a fibrose no fígado perinatal e fizeram a associação com a causa de morte (Nadeev e Shkurupii 2006). Estudos semelhantes ao nosso em material de autópsia perinatal podem servir não somente para a determinação da causa de morte, mas também para a determinação de lesões que são causadas por intercorrências perinatais que nem sempre estão associadas ao óbito. Com a melhoria das técnicas de atendimento perinatal o conhecimento de quais as lesões estão associadas a intercorrências perinatais pode ajudar ao diagnóstico precoce da evolução destas doenças na infância.

A hematopoiese, que consiste na formação de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, é encontrada em vários tipos de alterações perinatais. A eritropoiese é a maior atividade da hematopoiese hepática (Miranda e cols. 2006), sendo a variável avaliada neste estudo.

O número de focos de eritropoiese extramedular foi significativamente maior entre os prematuros. Células hematopoiéticas primitivas se formam no saco coriônico por volta de 18 dias de gestação. Durante a quarta semana de gestação, vasos sangüíneos do saco coriônico se conectam com a aorta dorsal e o

coração, possibilitando a colonização do fígado primitivo por células hematopoiéticas. O fígado é o principal sítio de hematopoiese no primeiro trimestre de gestação, onde os eritrócitos em íntimo contato com macrófagos se diferenciam no fígado, expulsando seu núcleo antes de entrar na circulação. Durante o segundo trimestre a hematopoiese passa a ocorrer na medula óssea, e a produção hepática de células sangüíneas continua diminuindo durante o terceiro trimestre, cessando após o nascimento (Palis e Segel 1998). Os períodos em que há formação das células sangüíneas justificam o maior número de focos de eritropoiese encontrados nos prematuros neste estudo. Esta seqüência também explica a correlação negativa e significativa entre a idade gestacional e o número de focos de eritropoiese extramedular encontrada.

Um dos aspectos mais marcantes de hematopoiese pré-natal é que o processo ocorre em ambientes celulares diferentes, embrionariamente e anatomicamente, refletindo a grande capacidade de adaptação do sistema sangüíneo fetal às rápidas mudanças que ocorrem durante a gestação (Tavian e Péault 2005).

No presente estudo os prematuros com asfixia e infecção apresentaram idade gestacional semelhante, no entanto a eritropoiese extramedular foi maior nos casos com infecção. Alterações durante o desenvolvimento e no parto podem contribuir para uma readaptação do sistema sangüíneo fetal, alterando a eritropoiese (Wigglesworth 1996; Dando e cols. 2005). Mecanismos fisiológicos de resposta à combinação de citocinas pró-inflamatórias, que são potencializadas pela ação do cortisol como a IL-6, IL-10 e TNF $\alpha$ , e hormônios, modulam a hematopoiese, principalmente dos eritrócitos hepáticos (Lim e cols.



2000; Chagraoui e cols. 2003; Dolznig e cols. 2005). Para confirmação deste mecanismo seriam necessários estudos semelhantes ao nosso, mas que além da contagem do número de focos de eritropoiese extramedular, realizassem as análises de expressão de citocinas (Lee e cols. 2002). A maioria dos estudos sobre a eritropoiese abrange os primeiros estágios da gestação. Em estudo semelhante ao nosso que se avaliou a hematopoiese hepática em fetos cuja causa de óbito foi infecção ascendente no período entre 20 e 41 semanas de idade gestacional demonstrou-se uma associação entre corioamnionite, funisite e aumento da hematopoiese hepática, sugerindo que a última fase da resposta fetal à infecção do líquido amniótico ocorreu no fígado (Miranda e cols. 2006).

Nas gestações a termo neste estudo os casos com asfixia apresentaram uma quantidade maior de focos de eritropoiese. Alguns estudos sugerem que marcadores hepáticos como *Notch/Delta*, via estroma hepático, teriam como única função a manutenção do estoque de células tronco hematopoiéticas no fígado, e também esse estoque funcionaria como uma resistência do feto ao *stress* causado por hipóxia. Nestes casos, há aumento dos níveis de eritropoetina e VEGF (fator de crescimento derivado do endotélio vascular). A eritropoetina pode induzir a expressão de moléculas Delta 4, proteína ativada nas células tronco hematopoiéticas, aumentando a quantidade de eritrócitos para aliviar a hipóxia enquanto os estímulos permanecem (Dando e cols. 2005). Além disso, o significado dos nossos achados é incerto, podendo ser relacionados a um pequeno tempo de resposta à doença ou para o óbito perinatal.

De acordo com nosso estudo independente do tipo de *stress* ocorre alteração na eritropoiese hepática. Os focos de eritropoiese sofrem influência de estímulos infecciosos ou alteração nos níveis de oxigenação, sendo a diferença da resposta relacionada à idade gestacional.

1 *Objetivo V. Comparar entre os tipos de causa de morte a imunomarcção anti-receptor*  
2 *1A para melatonina e anti-triptofano-hidroxiase nas placentas*  
3 *de autópsias perinatais.*

4  
5 *Introdução*

6 A melatonina é um hormônio, sintetizado a partir do triptofano na  
7 pineal e em outros órgãos de vertebrados. É classificada como indolamina,  
8 tendo como precursor a serotonina, um importante neurotransmissor (Basile e  
9 cols. 2004). A melatonina e seus ligantes podem ser localizados no trato  
10 gastrointestinal, considerado a maior área de produção extrapineal, sendo  
11 produzida por células da mucosa intestinal. Atua de forma parácrina ou  
12 autócrina sobre o epitélio gastrointestinal, tecidos linfáticos do sistema imune  
13 e células musculares lisas do tubo digestório, sincronizando o processo de  
14 digestão (Bubenic 2001). Também é encontrada na vesícula biliar (Aust e cols.  
15 2004), no fígado (Romeo e cols. 2000), no timo (Kvertnoy 2003), no endométrio  
16 (Zhao e cols. 2000), nas supra-renais (Torres-Farfan e cols 2003), no rim (Drew  
17 e cols. 1998), no coração, no pulmão, na pele, nos testículos e ovários (Drew e  
18 cols 2003), e na placenta (Kvetnoy, 2002), demonstrando a coordenação do  
19 ritmo biológico sincronizada entre o sistema nervoso central e os tecidos  
20 periféricos (Drew e cols. 2003), sendo o único hormônio do sistema  
21 neuroendócrino presente em todos os sistemas. A melatonina também pode ser  
22 identificada em outras células, como mastócitos, linfócitos, eosinófilos,  
23 plaquetas e células endoteliais (Kvetnoy 2002).

24 A melatonina é considerada um dos mais potentes antioxidantes  
25 naturais (Gitto e cols. 2001), sendo capaz de controlar o *stress* oxidativo por  
26 vários mecanismos: indução de enzimas antioxidantes e inibindo pró-  
27 oxidativas; estabilizando a membrana celular e aumentando a eficiência da  
28 fosforilação oxidativa na mitocôndria (Reiter e cols. 2000). Atua ainda,  
29 aumentando a atividade de enzimas da cadeia respiratória e revertendo efeitos  
30 deletérios produzidos por substâncias sintetizadas durante a infecção e  
31 alteração mitocondrial (Romeo e cols. 1999).

32 A supressão da melatonina endógena em camundongos reduz a  
33 atividade do baço e do timo; por outro lado, a administração crônica de  
34 melatonina aumenta a atividade dos linfócitos T auxiliares e a produção da IL-  
35 2 e IL-1 por macrófagos. Foi proposto um duplo papel da melatonina na  
36 regulação da resposta imune: ativação do sistema imune seguida de controle de  
37 microrganismos (vírus e bactérias) por potencializar a resposta Th1, a função  
38 dos macrófagos e a produção de citocinas; o outro papel ocorre em longo prazo,  
39 modulando a função imune, afetando a hematopoiese e a mitose nos timócitos  
40 (Macchi 2004; Bruce 2004). Estudos sugerem mecanismos de ação da  
41 melatonina no sistema imune, baseando-se na detecção de seus receptores em  
42 órgãos linfóides e linfócitos (Poon e Pang 1986).

43 Nos recém-nascidos, a melatonina é produzida em pequenas  
44 quantidades e outros agentes antioxidantes como a vitamina E,  $\beta$ -caroteno,  
45 riboflavina, e enzimas como a superóxido-dismutase são reduzidos (Gitto e cols.  
46 2004). Todavia, a melatonina materna é capaz de cruzar a placenta e  
47 influenciar o ritmo circadiano fetal, evidenciado pela frequência cardíaca e

48 respiratória, pela movimentação corporal e temperatura, através da interação  
49 com seus receptores presentes em tecidos centrais e periféricos desde o início  
50 do desenvolvimento fetal (Thomas e cols. 1998).

51 Embora sejam descritos seus mecanismos no controle do ritmo circadiano  
52 fetal, não está bem estabelecido se a atuação da melatonina em condições de  
53 *stress* fetal. Como antioxidante nestes casos, ainda não foi estabelecida a  
54 forma de atuação da melatonina, se seria central ou periféricamente sobre os  
55 órgãos alvo acometidos pela infecção (Gitto e cols. 2004). Além disso, estudos  
56 identificam a melatonina na placenta (Kvetnoy 2002), mas não foram  
57 encontradas na literatura informações sobre os mecanismos de síntese, células  
58 produtoras, bem como as alterações possivelmente associadas a condições de  
59 *stress* fetal.

60 O objetivo deste estudo é avaliar a expressão de enzimas relacionadas à  
61 síntese de melatonina, como a Triptofano-hidroxilase, bem como a expressão de  
62 receptores para melatonina, como o receptor 1A, comparando as variações  
63 destes fatores em relação à causa de morte em crianças autopsiadas no período  
64 perinatal.

65

65 *Material e métodos*

66 Das 164 autópsias iniciais, foram incluídos os casos em que a placenta  
67 foi enviada para exame anatomopatológico junto com o feto ou neonato  
68 autopsiado para Disciplina de Patologia Geral da Universidade Federal do  
69 Triângulo mineiro, sendo obtido 56 casos. Foram excluídos os casos com  
70 autólise e os que não foram encontrados lâminas ou blocos. Após o pareamento  
71 pela idade gestacional, foram obtidos 18 casos, sendo 5 (27,8%) do grupo com  
72 causa de morte por Malformações Congênicas, 6 (33,3%) do grupo  
73 Hipóxia/Anóxia Perinatal e 7 (38,9%) do grupo de Infecção Ascendente (Anexo  
74 X).

75 A análise morfológica das placentas foi realizada previamente no  
76 exame de rotina de acordo com os protocolos estabelecidos na literatura  
77 (Driscoll e Langston 1991; Benirschke e Kaufmann 1995). Após a análise  
78 macroscópica o fragmento processado para imunohistoquímica foi o coletado da  
79 inserção do cordão umbilical. Em lâminas previamente tratadas com  
80 polilisina®, foram realizados cortes com 5 µm de espessura. Foi realizada a  
81 imunohistoquímica através da Técnica da Imunoperoxidase, para detecção da  
82 Triptofano-hidroxilase (*Tryptophan Hydroxylase antibody*–Novus  
83 Biologicals®) (Anexo XI) e do Receptor 1A (*Melatonin Receptor 1A antiody* –  
84 Novus Biologicals®) (Anexo XII). Em 5 casos a recuperação antigênica não foi  
85 eficaz para estabelecer a imunomarcção pelo Receptor 1A para melatonina,  
86 provavelmente devido à baixa idade gestacional e a autólise observada nestes  
87 casos. Portanto, para esse receptor, foi realizado um novo pareamento para a  
88 idade gestacional, sendo obtidos 11 casos: 4 (36,4%) do grupo com

89 Malformações Congênicas, 3 (27,2%) com Hipóxia/Anóxia Perinatal e 4 (36,4%)  
90 com Infecção Ascendente.

91 A quantificação das áreas imunomarcadas foi realizada em toda  
92 extensão dos cortes de 1cm<sup>2</sup>, sendo analisados em média 30 campos por corte  
93 no aumento de 400 vezes. A morfometria foi realizada com o sistema  
94 analisador de imagens “*KS 300 – Carl Zeiss*”. Os resultados foram expressos  
95 em porcentagem de área positiva por campo.

96 As variáveis foram testadas para verificar o tipo de distribuição através  
97 do teste de Kolmogorov-Smirnov e análise das variâncias. Quando a  
98 distribuição não foi normal, ou quando ela foi normal e com variâncias não  
99 semelhantes, foram utilizados testes não paramétricos: o teste de Mann-  
100 Whitney (T) na comparação entre dois grupos, e o teste de Kruskal-Wallis (H)  
101 na comparação entre três ou mais grupos, seguido pelo teste de Dunn quando  
102 necessário. Neste tipo de distribuição os resultados foram expressos em  
103 mediana e valores mínimos e máximos (Med – 25% - 75%). A correlação entre  
104 duas variáveis, que apresentaram distribuição normal foi analisada pelo  
105 coeficiente de correlação de Pearson (Pr). Foram consideradas estatisticamente  
106 significativas as diferenças em que o nível de significância foi menor que 5%  
107 ( $p < 0,05$ ).

108

108 **Resultados**

109 A imunohistoquímica utilizando o anticorpo anti-triptofano-hidroxilase  
110 demonstrou padrão de marcação citoplasmática no trofoblasto e nas células  
111 inflamatórias do espaço intervilloso (Objetivo V – Figura 1), enquanto a  
112 imunohistoquímica utilizando anti-receptor 1A para melatonina demonstrou a  
113 marcação destas mesmas estruturas, e também do endotélio vascular (Objetivo  
114 V – Figura 2).

115 A porcentagem de área de células positivas por campo para expressão de  
116 triptofano-hidroxilase e receptor 1A para melatonina foi significativamente  
117 maior nos casos com *stress* intra-uterino (Tabela 1 e 2).

118  
119 Tabela 1. Comparação da porcentagem de área de células positivas por campo  
120 para expressão de triptofano-hidroxilase e de receptor 1A para melatonina  
121 entre os diferentes grupos de causa de morte diagnosticadas nas autópsias  
122 perinatais.

123

Grupos	n (%)	TH (% acpc)			n (%)	Melatonina – R 1A (% acpc)		
		Mediana	25%	75%		Mediana	25%	75%
MC	5 (27,8)	6,2	2,4	9,9	4 (36,4)	9,3	7,6	11,8
HAP	6 (33,3)	5,3	3,3	10,9	3 (27,2)	14,0	8,6	20,6
IA	7 (38,9)	8,1	4,5	12,2	4 (36,4)	10,7	6,8	13,7
Total	18 (100)				11 (100)			
Testes		*H= 12,839; p= 0,002				**H = 15,759; p< 0,001		

124 \*Dunn: MC X IA – p< 0,05. \*\*Dunn: MC X HAP – p< 0,05. MC: Malformação  
125 Congênita; HAP: Hipóxia/Anóxia Perinatal; IA: Infecção Ascendente; TH:  
126 Triptofano-hidroxilase; R 1A: Receptor 1A. acpc: Área de células positivas por  
127 campo.

128



128 Tabela 2. Comparação da porcentagem de área de células positivas por campo  
129 para expressão de triptofano-hidroxilase e do receptor 1A para melatonina  
130 entre os grupos de Malformações Congênicas e com *stress* crônico  
131 (Hipóxia/Anóxia Perinatal e Infecção Ascendente) das autópsias perinatais.  
132

Grupos	n (%)	TH (% acpc)			n (%)	Melatonina – R 1A (% acpc)		
		Mediana	25%	75%		Mediana	25%	75%
MC	5 (27,8)	6,2	2,4	9,9	4 (36,4)	9,3	7,6	11,8
<i>Stress</i>	13 (72,2)	6,7	3,8	11,8	7 (63,6)	12,0	7,8	18,3
Total	18 (100)				11 (100)			
Testes		T = 23324,500; p= 0,016				T = 4685,500; p= 0,012		

133 Malformação Congênita; TH: Triptofano-hidroxilase; R 1A: Receptor 1A. acpc:  
134 Área de células positivas por campo.

135

135 Não houve diferença significativa entre a porcentagem da área de  
136 células positivas por campo para expressão de triptofano-hidroxilase entre as  
137 gestações a termo e os prematuros. A porcentagem da área de células positivas  
138 por campo para expressão do receptor 1A foi significativamente maior nas  
139 gestações a termo (Tabela 3).

140 Tabela 3. Comparação da porcentagem de área de células positivas por campo  
141 para expressão de triptofano-hidroxilase e do Receptor 1A da melatonina, entre  
142 as gestações a termo e nos prematuros das autópsias perinatais.

143

Grupos	n (%)	TH (% acpc)			n (%)	Melatonina – R 1A (% acpc)		
		Mediana	25%	75%		Mediana	25%	75%
Termo	3 (16,7)	6,5	4,0	10,6	2 (18,2)	15,6	11,7	22,9
Prematuro	15 (83,3)	6,5	3,3	11,1	9 (81,8)	8,5	5,8	11,8
Total	18 (100)				11 (100)			

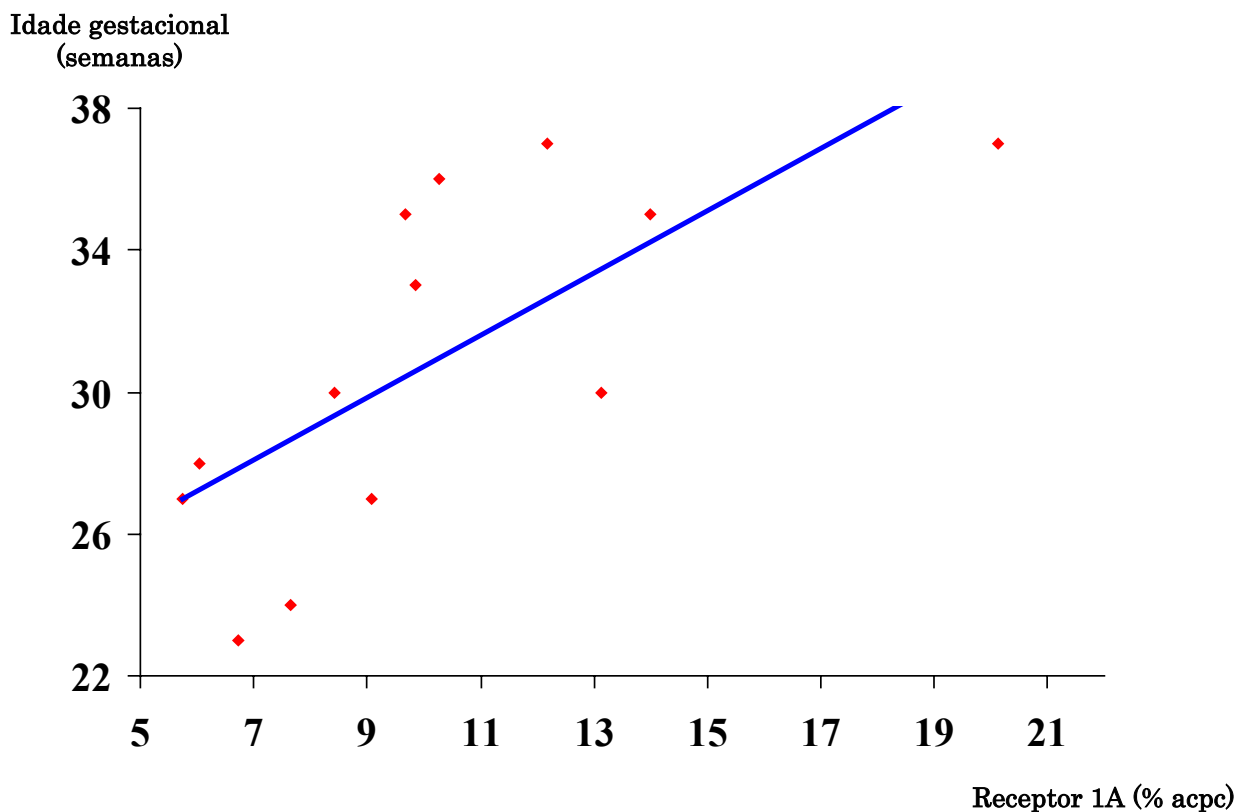
Testes T = 17848,500; p = 0,893 T = 11062,500; p < 0,001

144 TH: Triptofano-hidroxilase; R 1A: Receptor 1A. acpc: Área de células positivas  
145 por campo.

146 Houve correlação positiva e significativa entre a idade gestacional e a  
147 porcentagem de área por campo positiva para expressão de receptor 1A na  
148 placenta (Pr: 0,705; p: 0,007) (Figura 3).

149

149 Figura 3. Correlação entre a porcentagem de área por campo positiva para  
150 expressão de receptor 1A na placenta e a idade gestacional nas autópsias  
151 perinatais.



152

153

Coefficiente de correlação - Pr: 0,705, p= 0,007

154

154 *Discussão*

155 As principais estruturas imunomarcadas foram o trofoblasto e células  
156 inflamatórias no espaço interviloso, quando utilizado o anti-triptofano  
157 hidroxilase, e ainda houve marcação do endotélio vascular nos casos de  
158 imunomarcação pelo anti-receptor 1A para melatonina. Na placenta estudos  
159 demonstram, através da reação de cadeia em polimerase, a expressão de  
160 receptores para melatonina como o MT1 and MT2, e enzimas como a  
161 arilalkilamina N-acetil-transferase e a hydroxil-O-metiltransferase, que são  
162 utilizadas no processo de conversão de serotonina em melatonina (Iwasaki e  
163 cols. 2005). No entanto, não foram encontrados estudos na literatura que  
164 descrevessem a localização *in situ* destes marcadores. A imunomarcação do  
165 endotélio vascular e de células inflamatórias é descrita em outros órgãos  
166 (Kvetnoy 2002). Em relação ao trofoblasto, a imunomarcação foi evidenciada  
167 tanto no uso do anti-triptofano-hidroxilase, como do anti-receptor 1A para  
168 melatonina, reforçando a hipótese de outros estudos que sugeriram uma  
169 capacidade de regulação da função placentária de maneira parácrina e  
170 autócrina pela melatonina (Iwasaki e cols. 2005). Estudos demonstram que o  
171 uso de melatonina exógena aumenta a síntese de substâncias como a  
172 glutadiona peroxidase do córion, que passa a proteger indiretamente contra as  
173 lesões provocadas por radicais livres (Okatani e cols 2001).

174 A porcentagem de área de células positivas por campo para anti-  
175 triptofano-hidroxilase e anti-receptor 1A para melatonina foi  
176 significativamente maior nos casos com *stress* intra-uterino. Funcionalmente,  
177 as células envolvidas na produção de melatonina podem ser consideradas uma

178 parte do sistema neuroendócrino, com função antioxidante direta, e  
179 indiretamente, proteção contra lesões causadas pela produção de radicais  
180 livres (Okatani e cols 2001; Kvetnoy 2002;). No presente estudo, o aumento  
181 tanto de receptores de melatonina como da enzima produzida como parte de  
182 sua síntese nos casos com *stress* intra-uterino comprovam sua atuação nos  
183 mecanismos de proteção na placenta.

184         Em condições de *stress* a produção de espécies reativas de oxigênio  
185 influencia na patogênese das lesões e suas complicações (Batra e cols. 2000).  
186 Os tecidos lesados são permeados por macrófagos, que secretam citocinas como  
187 a Interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Estas ativam  
188 células inflamatórias como neutrófilos, macrófagos/monócitos, plaquetas e  
189 mastócitos, que liberam grande quantidade de substâncias oxidantes, reagindo  
190 com o oxigênio e causando lesão celular por peroxidação das membranas  
191 lipídicas e alteração das proteínas do DNA (Gitto e cols. 2001). Estas  
192 substâncias oxidativas estão em maiores concentrações em neonatos com  
193 septicemia (Batra e cols. 2000), mas também podem ser encontradas em  
194 crianças com hipóxia (Okatani e cols. 2001). Em nosso estudo foi demonstrado  
195 que independente da causa do *stress* intra-uterino ocorreu aumento da síntese  
196 de melatonina, através da marcação da anti-triptofano-hidroxilase, e de sua  
197 ação, através da maior expressão do receptor 1A na placenta.

198         Em neonatos a produção de melatonina é pequena fazendo com que  
199 nesta faixa etária a ação de radicais livres produzidos em resposta ao *stress*  
200 intra-uterino seja mais prejudicial (Gitto e cols 2004). Por causa disto, a  
201 melatonina tem sido usada em neonatos com sepse, hipóxia perinatal e

202 doenças respiratórias (Gitto e cols 2004). Em nosso estudo demonstramos a  
203 possibilidade de produção de melatonina pela placenta, abrindo a possibilidade  
204 do uso de estimuladores exógenos desta produção na vida intra-uterina.

205 A expressão do receptor 1A foi significativamente maior nas gestações  
206 a termo, tendo correlação positiva e significativa com a idade gestacional.  
207 Estes dados sugerem uma maior maturidade do sistema imune placentário na  
208 resposta ao *stress* intra-uterino.

209 Em conclusão, a importância de nosso estudo reside na caracterização  
210 do trofoblasto em relação a melatonina, envolvido na produção, e também  
211 sendo um local de sua ação. A atuação da melatonina independe do tipo de  
212 estímulo, sendo parte da resposta placentária a diferentes tipos de *stress* intra-  
213 uterino. Estes dados podem ter uma aplicação terapêutica em várias  
214 intercorrências perinatais que envolvem lesões causadas pela produção de  
215 radicais livres, entre elas a infecção ascendente e a hipóxia perinatal.

## *Considerações Finais*

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11

Após análise de vários órgãos envolvidos na resposta ao stress intra-uterino observamos que as lesões morfológicas encontradas são consequência da resposta fetal ao stress, mas independem do seu tipo. Este estudo reforçou a idéia de que a lesão nos órgão fetal deve ser utilizada para estabelecer a presença de doença fetal antes da morte, mas que as alterações não são específicas para um tipo de mecanismo de morte fetal. O estudo sobre a produção e as células alvos da melatonina acrescentaram mais um passo no entendimento do mecanismo de ação deste hormônio e abrem novas possibilidades terapêuticas.

## Conclusões

- 1  
2 1. Diferentes causas de morte podem influenciar nos parâmetros  
3 antropométricos nas autópsias pediátricas realizadas no período  
4 perinatal, sendo que sua análise contribui para melhorar a  
5 interpretação dos achados de autópsia e a sua relação anatomoclínica.
- 6 2. O grau de vacuolização da supra-renal foi relacionado à resposta fetal ao  
7 *stress*, que causou a morte fetal, em nossos casos provocada pela  
8 Hipóxia/Anóxia Perinatal e pela Infecção Ascendente.
- 9 3. O aumento do número de macrófagos e das alterações morfológicas  
10 relacionadas ao *stress* no timo é indicativo de hipóxia intra-uterina  
11 conseqüente a uma doença crônica.
- 12 4. O acúmulo citoplasmático de lipídios é uma alteração freqüentemente  
13 encontrada em autópsias perinatais a termo, tendo como conseqüência o  
14 aumento do peso hepático e não apresentando relação com a causa de  
15 morte. A porcentagem de fibrose no fígado foi maior nos casos com  
16 Hipóxia/Anóxia Perinatal e Infecção Ascendente, e aumenta de acordo  
17 com a idade gestacional. Ocorre alteração na eritropoiese hepática  
18 independente do tipo de *stress*. Os focos de eritropoiese sofrem  
19 influência de estímulos infecciosos ou alteração nos níveis de oxigenação,  
20 sendo a diferença da resposta relacionada à idade gestacional.
- 21 5. A atuação da melatonina independe do tipo de estímulo, sendo parte da  
22 resposta placentária a diferentes tipos de *stress* intra-uterino, entre eles  
23 a infecção ascendente e a hipóxia perinatal. O trofoblasto é envolvido na  
24 produção e também na ação da melatonina.



## *Referências Bibliográficas*

As publicações referenciadas nesta tese foram normatizadas de acordo com os critérios do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas – ICMJE (<http://www.icmje.org>), “Estilo de Vancouver”, acessado em 15/01/2007; e do Curso de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, contidas no Manual do Pós-graduando ([http://www.uftm.edu.br/patolo/manual\\_pgraduando.htm](http://www.uftm.edu.br/patolo/manual_pgraduando.htm)), acessado em 15/01/2007.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

1. Alexander GR, Kogan M, Bader D, Carlo W, Allen M, Mor J. US birth weight/gestational age-specific neonatal mortality: 1995-1997 rates for whites, hispanics, and blacks. *Pediatrics*. 2003 Jan;111(1):61-6.
2. Alexander J, Godfrey KM, Wood P, Osmond C, Goulden P, Phillips DI. Fetal growth and the adrenocortical response to psychological stress. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 May; 91(5):1868-71.
3. Andrade ZA. Regression of hepatic fibrosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2005 Nov-Dez;38(6):514-520.
4. Apgar V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr Res Anesth Analg*. 1953 Jul-Aug;32(4):260-7.
5. Aust S, Thalhammer T, Humpeler S, Jager W, Klimpfinger M, Tucek G, e cols. The melatonin receptor subtype MT1 is expressed in human gallbladder epithelia. *J Pineal Res*. 2004 Jan;36(1):43-8.
6. Basile M, Romeo C, Gitto E, Spitz L, Pierro A, Eaton S. Melatonin protects from, but does not reverse, the effects of mediators of sepsis on liver bioenergetics. *Pediatr Surg Int*. 2004 Apr;20(4):263-6.
7. Batra S, Kumar R, Seema, Kapoor AK, Ray G. Alterations in antioxidant status during neonatal sepsis. *Ann Trop Paediatr*. 2000 Mar;20(1):27-33.
8. Becker MJ, Becker AE. Fat distribution in the adrenal cortex as an indication of the mode of intrauterine death. *Hum Pathol*. 1976 Sep;7(5):495-504.

- 24 9. Benassayag C, Mignot TM, Haourigui M, Civel C, Hassid J, Carbonne B,  
25 e cols. High polyunsaturated fatty acid, thromboxane A2, and alpha-  
26 fetoprotein concentrations at the human feto-maternal interface. *Lipid*  
27 *Res.* 1997 Feb;38(2):276-86.
- 28 10. Bendon RW, Coventry S. Non-iatrogenic pathology of the preterm  
29 infant. *Semin Neonatol.* 2004 Aug;9(4):281-7
- 30 11. Beraldo WT. Sistema endócrino. In: *Fisiologia.* Belo Horizonte:  
31 Universidade Federal de Minas Gerais; 1978.
- 32 12. Berry CL. The reticuloendothelial system and blood. In: Keeling JW  
33 (ed): *Fetal and Neonatal Pathology.* London, United Kingdom, Springer-  
34 Verlag, 1993, p. 529-39.
- 35 13. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA,  
36 Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and  
37 staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999  
38 Sep;94(9):2467-74.
- 39 14. Bubenik GA. Localization, physiological significance and possible  
40 clinical implication of gastrointestinal melatonin. *Biol Signals Recept.*  
41 2001 Nov-Dec;10(6):350-66.
- 42 15. Butler TG, Schwartz J, McMillen IC. Differential effects of the early and  
43 late intrauterine environment on corticotrophic cell development. *J Clin*  
44 *Invest.* 2002 Sep;110(6):783-91.
- 45 16. Calhoun DA, Li Y, Braylan RC, Christensen RD. Assessment of the  
46 contribution of the spleen to granulocytopoiesis and erythropoiesis of the  
47 mid-gestation human fetus. *Early Hum Dev.* 1996 Nov 21;46(3):217-27.

- 48 17. Callaghan WM, MacDorman MF, Rasmussen SA, Qin C, Lackritz EM.  
49 The contribution of preterm birth to infant mortality rates in the United  
50 States. *Pediatrics*. 2006 Oct;118(4):1566-73.
- 51 18. Chagraoui J, Lepage-Noll A, Anjo A, Uzan G, Charbord P. Fetal liver  
52 stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. *Blood*.  
53 2003 Apr 15;101(8):2973-82.
- 54 19. Cowan WK, Sorenson GD. Electron microscopic observations of acute  
55 thymic involution produced by hydrocortisone. *Lab Invest*. 1964  
56 Apr;13:353-70.
- 57 20. Cumano A, Godin I. Ontogeny of the Hematopoietic System. *Annu Rev*  
58 *Immunol*. 2007 Jan 2. [Epub ahead of print]
- 59 21. Daimon T, David H, von Zglinicki T, Marx I. Correlated ultrastructural  
60 and morphometric studies on the liver during prenatal development of  
61 rats. *Exp Pathol*. 1982;21(4):237-50.
- 62 22. Dakovic-Bjelakovic M, Vlajkovic S, Cukuranovic R, Antic S, Bjelakovic  
63 G, Mitic D. Changes of the glomerular size during the human fetal  
64 kidney development. *Srp Arh Celok Lek*. 2006 Jan-Feb;134(1-2):33-9.
- 65 23. Dando JS, Tavian M, Catelain C, Poirault S, Bennaceur-Griscelli A,  
66 Sainteny F, e cols. Notch/Delta4 interaction in human embryonic liver  
67 CD34+ CD38- cells: positive influence on BFU-E production and LTC-IC  
68 potential maintenance. *Stem Cells*. 2005 Apr;23(4):550-60.
- 69 24. D'Argenio P, Triassi M, Arsieri R, Pugliese A, D'Armiento M, Russo R e  
70 cols. The validity of the certification of natimortality: the experience of a  
71 local study. *Epidemiol Prev*. 1995 Sep;19(64):266-9.

- 72 25. David H. The hepatocyte. Development, differentiation, and ageing. Exp  
73 Pathol Suppl. 1985;11:1-148.
- 74 26. De Felipe C, Toti P, Santopietro R, Stumpo M, Pecciarini L, Bagnoli F.  
75 Small thymus in very low birth weight infants born to mothers with  
76 subclinical chorioamnionitis. J Pediatr. 1999 Sep;135(3):384-6.
- 77 27. Delprado WJ, Baird PJ. The fetal adrenal gland: definitive cortex cystic  
78 change, lipid patterns, and their relationship to fetal disease and  
79 maturity. Pathology. 1984 Jul;16(3):312-7.(b)
- 80 28. Delprado WJ, Baird PJ. The fetal adrenal gland: lipid distribution with  
81 associated intrauterine hypoxia. Pathology. 1984 Jan;16(1):25-9.(b)
- 82 29. Deulofeut R, Critz A, Adams-Chapman I, Sola A. Avoiding hyperoxia in  
83 infants < or = 1250 g is associated with improved short- and long-term  
84 outcomes. J Perinatol. 2006 Nov;26(11):700-5.
- 85 30. Dollner H, Vatten L, Halgunset J, Rahimipour S, Austgulen R.  
86 Histologic chorioamnionitis and umbilical serum levels of pro-  
87 inflammatory cytokines and cytokine inhibitors. BJOG. 2002  
88 May;109(5):534-9.
- 89 31. Dolznig H, Kolbus A, Leberbauer C, Schmidt U, Deiner EM, Mullner  
90 EW e cols. Expansion and differentiation of immature mouse and  
91 human hematopoietic progenitors. Methods Mol Med. 2005;105:323-44.
- 92 32. Drew JE, Barrett P, Mercer JG, Moar KM, Canet E, Delagrangé P, e  
93 cols. Localization of the melatonin-related receptor in the rodent brain  
94 and peripheral tissues. J Neuroendocrinol. 2001 May;13(5):453-8.

- 95 33.Drew JE, Williams LM, Hannah LT, Barrett P, Abramovich DR.  
96 Melatonin receptors in the human fetal kidney: 2-[125I]iodomelatonin  
97 binding sites correlated with expression of Mel1a and Mel1b receptor  
98 genes. J Endocrinol. 1998 Feb;156(2):261-7.
- 99 34.Eric M, Vuckovic N, Pilija V, Misolic M. Occurrence of congenital  
100 malformations in dead fetuses and neonates autopsied between 1991  
101 and 2001 at the Institute of Pathology and Histology in Novi Sad. Med  
102 Pregl. 2003 Jul-Aug;56(7-8):373-6.
- 103 35.Fayon M, Lamireau T, Bioulac-Sage P, Letellier T, Moretto B, Parrot-  
104 Roulaud F, e cols. Fatal neonatal liver failure and mitochondrial  
105 cytopathy: an observation with antenatal ascites. Gastroenterology.  
106 1992 Oct;103(4):1332-5.
- 107 36.Faye-Petersen OM, Guinn DA, Wenstrom KD. Value of perinatal  
108 autopsy. Obstet Gynecol. 1999 Dec;94(6):915-20.
- 109 37.Fayon M, Lamireau T, Bioulac-Sage P, Letellier T, Moretto B, Parrot-  
110 Roulaud
- 111 38.Fonseca SC, Coutinho Eda S. Perinatal mortality research in Brazil:  
112 review of methodology and results. Cad Saude Publica. 2004  
113 May;20(1):S7-19.
- 114 39.Georgsdottir I, Geirsson RT, Johannsson JH, Biering G, Snaedal G. Can  
115 we expect to lower perinatal and neonatal mortality? Acta Obstet  
116 Gynecol Scand. 1989;68(2):109-12.
- 117 40.Gicquel C, Le Bouc Y. Hormonal regulation of fetal growth. Horm Res.  
118 2006; Apr 65;10(3):28-33.

- 119 41. Gitto E, Karbownik M, Reiter RJ, Tan DX, Cuzzocrea S, Chiurazzi P, e  
120 cols. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr Res.*  
121 2001 Dec;50(6):756-60
- 122 42. Gitto E, Karbownik M, Reiter RJ, Tan DX, Cuzzocrea S, Chiurazzi P, e  
123 cols. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr Res.*  
124 2001 Dec;50(6):756-60.
- 125 43. Gitto E, Romeo C, Reiter RJ, Impellizzeri P, Pesce S, Basile M, e cols.  
126 Melatonin reduces oxidative stress in surgical neonates. *J Pediatr Surg.*  
127 2004 Feb;39(2):184-9.
- 128 44. Glavina-Durdov M, Springer O, Capkun V, Saratlija-Novakovic Z, Rozic  
129 D, Barle M. The grade of acute thymus involution in neonates correlates  
130 with the duration of acute illness and with the percentage of  
131 lymphocytes in peripheral blood smear. Pathological study. *Biol*  
132 *Neonate.* 2003;83(4):229-34.
- 133 45. Gordijn SJ, Erwich JJ, Khong TY. Value of the perinatal autopsy:  
134 critique. *Pediatr Dev Pathol.* 2002 Sep-Oct;5(5):480-8.
- 135 46. Gruenwald P, Minh HN. Evaluation of body and organ weights in  
136 perinatal pathology. II. Weight of body and placenta of surviving and of  
137 autopsied infants. *Am J Obstet Gynecol.* 1961;82:310-19.
- 138 47. Hale LP, Braun RD, Gwinn WM, Greer PK, Dewhirst MW. Hypoxia in  
139 the thymus: role of oxygen tension in thymocyte survival. *Am J Physiol*  
140 *Heart Circ Physiol.* 2002 Apr;282(4):1467-77.
- 141 48. Hale LP. Histologic and molecular assessment of human thymus. *Ann*  
142 *Diagn Pathol.* 2004 Feb;8(1):50-60.

- 143 49. Hey EN, Lloyd DJ, Wigglesworth JS. Classifying perinatal death: fetal  
144 and neonatal factors. Br J Obstet Gynaecol. 1986 Dec;93(12):1213-23.
- 145 50. Horn LC, Langner A, Stiehl P, Wittekind C, Faber R. Identification of  
146 the causes of intrauterine death during 310 consecutive autopsies. Eur J  
147 Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004 Apr 15;113(2):134-8.
- 148 51. Hubscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver  
149 disease. Histopathology. 2006 Nov;49(5):450-65.
- 150 52. Iwasaki S, Nakazawa K, Sakai J, Kometani K, Iwashita M, Yoshimura  
151 Y, e cols. Melatonin as a local regulator of human placental function. J  
152 Pineal Res. 2005 Oct;39(3):261-5.
- 153 53. Kunzel W, Misselwitz B. Unexpected fetal death during pregnancy--a  
154 problem of unrecognized fetal disorders during antenatal care? Eur J  
155 Obstet Gynecol Reprod Biol. 2003 Sep 22;110 Suppl 1:S86-92.
- 156 54. Kvetnoy I. Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for  
157 diagnosis, prognosis and treatment of illness. Neuro Endocrinol Lett.  
158 2002 Apr;23 Suppl 1:92-6.
- 159 55. Kvetnoy I. Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for  
160 diagnosis, prognosis and treatment of illness. Neuro Endocrinol Lett.  
161 2002 Apr;23 Suppl 1:92-6.
- 162 56. Kvetnoy I. Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for  
163 diagnosis, prognosis and treatment of illness. Neuro Endocrinol Lett.  
164 2002 Apr;23 Suppl 1:92-6.
- 165 57. Lee KS. Hepatic fibrogenesis. Korean J Gastroenterol. 2006  
166 Nov;48(5):297-305.



- 167 58.Lee Y, Gotoh A, Kwon HJ, You M, Kohli L, Mantel C, e cols.  
168 Enhancement of intracellular signaling associated with hematopoietic  
169 progenitor cell survival in response to SDF-1/CXCL12 in synergy with  
170 other cytokines. Blood. 2002 Jun 15;99(12):4307-17.
- 171 59.Lim FT, Scherjon SA, van Beckhoven JM, Brand A, Kanhai HH,  
172 Hermans JM e cols. Association of stress during delivery with increased  
173 numbers of nucleated cells and hematopoietic progenitor cells in  
174 umbilical cord blood. Am J Obstet Gynecol. 2000 Nov;183(5):1144-52.
- 175 60.Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional  
176 significance of melatonin. Front Neuroendocrinol. 2004 Sep-Dec;25(3-  
177 4):177-95.
- 178 61.Majzoub JA, Karalis KP. Placental corticotropin-releasing hormone:  
179 function and regulation. Am J Obstet Gynecol. 1999 Jan;180(1 Pt  
180 3):S242-6.
- 181 62.Maroun LL, Graem N. Autopsy standards of body parameters and fresh  
182 organ weights in nonmacerated and macerated human fetuses. Pediatr  
183 Dev Pathol. 2005 Mar-Apr;8(2):204-17.
- 184 63.Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The hepatic extracellular matrix.  
185 II. Ontogenesis, regeneration and cirrhosis. Virchows Arch A Pathol  
186 Anat Histopathol. 1993;423(2):77-84.
- 187 64.Mattos TC, Giugliani R, Haase HB. Congenital malformations detected  
188 in 731 autopsies of children aged 0 to 14 years. Teratology. 1987  
189 Jun;35(3):305-7.

- 190 65. Mesiano S, Jaffe RB. Role of growth factors in the developmental  
191 regulation of the human fetal adrenal cortex. *Steroids*. 1997  
192 Jan;62(1):62-72.
- 193 66. Miranda RN, Omurtag K, Castellani WJ, De las Casas LE, Quintanilla  
194 NM, Kaabipour E. Myelopoiesis in the liver of stillborns with evidence of  
195 intrauterine infection. *Arch Pathol Lab Med*. 2006 Dec;130(12):1786-91.
- 196 67. Mohan H, Bhardwaj S, Bal A. Congenital visceral malformations--role of  
197 perinatal autopsy in diagnosis. *Fetal Diagn Ther*. 2004 Mar-  
198 Apr;19(2):131-3.
- 199 68. Moreira DR. Correlação anatomoclínica – Estudo sobre a contribuição da  
200 necropsia como método diagnóstico do Hospital das Clínicas da UFMG  
201 [Tese de Mestrado]. Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.
- 202 69. Nadeev AP, Shkurupii VA. Human fetal liver in hematogenic infection  
203 (a morphometric study). *Arkh Patol*. 2006 Jan-Feb;68(1):30-3
- 204 70. Nanda K. Non-alcoholic steatohepatitis in children. *Pediatr Transplant*.  
205 2004 Dec;8(6):613-8.
- 206 71. Ngoc NT, Merialdi M, Abdel-Aleem H, Carroli G, Purwar M, Zavaleta N,  
207 e cols. Causes of stillbirths and early neonatal deaths: data from 7993  
208 pregnancies in six developing countries. *Bull World Health Organ*. 2006  
209 Sep;84(9):699-705.
- 210 72. Okatani Y, Wakatsuki A, Shinohara K, Kaneda C, Fukaya T. Melatonin  
211 stimulates glutathione peroxidase activity in human chorion. *J Pineal*  
212 *Res*. 2001 May;30(4):199-205.

- 213 73.OMS – Organização Mundial da Saúde; FIGO – Federação Internacional  
214 de Ginecologia e Obstetrícia. 1976. In: Rezende J, Montenegro CAB.  
215 Obstetrícia Fundamental. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- 216 74.OMS. World Health Organization. Perinatal mortality. A listing of  
217 available information. Geneva: World Health Organization; 1996.
- 218 75.Oppenheimer EH. Cyst formation in the outer adrenal cortex. Studies in  
219 the human fetus and newborn. Arch Pathol. 1969 Jun;87(6):653-9.
- 220 76.Pahal GS, Jauniaux E, Kinnon C, Thrasher AJ, Rodeck CH. Normal  
221 development of human fetal hematopoiesis between eight and seventeen  
222 weeks' gestation. Am J Obstet Gynecol. 2000 Oct;183(4):1029-34.
- 223 77.Palis J, Segel GB. Developmental biology of erythropoiesis. Blood Rev.  
224 1998 Jun;12(2):106-14..
- 225 78.Pereira FEL. Degenerações, morte celular e alterações do interstício. In:  
226 Brasileiro Filho B. Patologia Geral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;  
227 2004. p. 79-80.
- 228 79.Peres LC. Review of pediatric autopsies performed at a university  
229 hospital in Ribeirao Preto, Brazil. Arch Pathol Lab Med. 2006  
230 Jan;130(1):62-8.
- 231 80.Pfisterer, C.; Faber, R.; Horn, L. C. Chorioamnionitis-induced chances of  
232 fetal extramedullar hematopoiesis in the second trimester of gestation.  
233 Is diagnosis from fetal autopsy possible? Virchows Arch. 2005;446:150-  
234 156.

- 235 81. Pike IL. Maternal stress and fetal responses: evolutionary perspectives  
236 on preterm delivery. Am J Hum Biol. 2005 Jan-Feb;17(1):55-65.
- 237 82. Pinar H. Postmortem findings in term neonates. Semin Neonatol. 2004  
238 Aug;9(4):289-302.
- 239 83. Pohujani SM, Chittal SM, Raut VS, Sheth UK. Studies in stress induced  
240 changes on rat's adrenals. II. Effect of pre-treatment with steroids.  
241 Indian J Med Res. 1969 Jun;57(6):1087-90.b
- 242 84. Pohujani SM, Chittal SM, Raut VS, Sheth UK. Studies in stress induced  
243 changes on rat's adrenals. I. Effect of central nervous depressants.  
244 Indian J Med Res. 1969 Jun;57(6):1081-6.a
- 245 85. Poon SF, Pang SF. Pineal melatonin-immune system interaction. In:  
246 Tang PL, Pang SF, Reiter RJ, editors. Melatonin: A Universal  
247 Photoperiodic Signal with Diverse Action, Front Horm Res. Karger Base;  
248 1996. p.71–83.
- 249 86. Ragonesi SMA, Bertini AM, Camano L. Crescimento intra-uterino  
250 retardado: aspectos atuais. RAMB. 1997;43(2):143-178.
- 251 87. Reif S, Lu RB, Tano M, Terranova V, Young C, Fisher J, e cols.  
252 Perinatal food restriction in rats reduces the content but not  
253 concentration of liver extracellular matrix proteins. J Nutr. 1993  
254 May;123(5):811-6.
- 255 88. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the  
256 reduction of oxidative stress. A review. J Biomed Sci. 2000 Nov-  
257 Dec;7(6):444-58.

- 258 89. Rinaldo P, Yoon HR, Yu C, Raymond K, Tiozzo C, Giordano G. Sudden  
259 and unexpected neonatal death: a protocol for the postmortem diagnosis  
260 of fatty acid oxidation disorders. *Semin Perinatol.* 1999 Apr;23(2):204-  
261 10.
- 262 90. Roberts EA. Nonalcoholic steatohepatitis in children. *Curr*  
263 *Gastroenterol Rep.* 2003 Jun;5(3):253-9.
- 264 91. Romeo C, Eaton S, Quant PA, Spitz L, Pierro A. Neonatal oxidative liver  
265 metabolism: effects of hydrogen peroxide, a putative mediator of septic  
266 damage. *J Pediatr Surg.* 1999 Jul;34(7):1107-11.
- 267 92. Romeo C, Eaton S, Spitz L, Pierro A. Nitric oxide inhibits neonatal  
268 hepatocyte oxidative metabolism. *J Pediatr Surg.* 2000 Jan;35(1):44-8.
- 269 93. Roy KK, Baruah J, Kumar S, Malhotra N, Deorari AK, Sharma JB.  
270 Maternal antenatal profile and immediate neonatal outcome in VLBW  
271 and ELBW babies. *Indian J Pediatr.* 2006 Aug;73(8):669-73.
- 272 94. Sakamoto S, Kigawa T, Mizuno M, Minaguchi H, Satoh K, Jimbo T,  
273 Nakai T, Kuwabara Y. Adaptation mechanism in the fetus, with special  
274 reference to fetal endocrinology. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1977;63:1-  
275 19.
- 276 95. Sims MA, Collins KA. Fetal death. A 10-year retrospective study. *Am J*  
277 *Forensic Med Pathol.* 2001 Sep;22(3):261-5.
- 278 96. Singer DB. Hepatic erythropoiesis in infants of diabetic mothers: a  
279 morphometric study. *Pediatr Pathol.* 1986;5(3-4):471-9.
- 280 97. Smith R, Mesiano S, Chan EC, Brown S, Jaffe RB. Corticotropin-  
281 releasing hormone directly and preferentially stimulates

- 282 dehydroepiandrosterone sulfate secretion by human fetal adrenal  
283 cortical cells. J Clin Endocrinol Metab. 1998 Aug;83(8):2916-20.
- 284 98. Streeter GL. Weight sitting height head size, foot length and menstrual  
285 age of human embryo. Contrib Embryol Carnegie Inst 1920;11:143– 70.
- 286 99. Swain S, Agrawal A, Bhatia BD. Congenital malformations at birth.  
287 Indian Pediatr. 1994 Oct;31(10):1187-91.
- 288 100. Tamiolakis D, Kotini A, Jivannakis T, Papadopoulos N. Induction of  
289 hepatic granulopoiesis due to chorioamnionitis during the second  
290 trimester of development. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2003 Oct  
291 10;110(2):164-8.
- 292 101. Tasdelen E, Aksoy F, Arvas A, Berk Y, Ataoglu N, Dervisoglu S, Ilter  
293 O. Causes of fetal and neonatal death. Turk J Pediatr. 1995 Jul-  
294 Sep;37(3):201-7.
- 295 102. Tavian M, Peault B. The changing cellular environments of  
296 hematopoiesis in human development in utero. Exp Hematol. 2005  
297 Sep;33(9):1062-9.
- 298 103. Thomas L, Drew JE, Abramovich DR, Williams LM. The role of  
299 melatonin in the human fetus (review). Int J Mol Med. 1998  
300 Mar;1(3):539-43.
- 301 104. Torres-Farfan C, Richter HG, Rojas-Garcia P, Vergara M, Forcelledo  
302 ML, Valladares LE, e cols. mt1 Melatonin receptor in the primate  
303 adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol  
304 production by melatonin. J Clin Endocrinol Metab. 2003 Jan;88(1):450-  
305 8.

- 306 105. Toti P, De Felice C, Stumpo M, Schurfeld K, Di Leo L, Vatti R,  
307 Bianciardi G, Buonocore G, Seemayer TA, Luzi P. Acute thymic  
308 involution in fetuses and neonates with chorioamnionitis. Hum Pathol.  
309 2000 Sep;31(9):1121-8.
- 310 106. van Baarlen J, Schuurman HJ, Huber J. Acute thymus involution in  
311 infancy and childhood: a reliable marker for duration of acute illness.  
312 Hum Pathol. 1988 Oct;19(10):1155-60.
- 313 107. Varas A, Jimenez E, Sacedon R, Rodriguez-Mahou M, Maroto E,  
314 Zapata AG, e cols. Analysis of the human neonatal thymus: evidence for  
315 a transient thymic involution. J Immunol. 2000 Jun 15;164(12):6260-7.
- 316 108. Vujanic GM, Cartlidge PH, Stewart JH. Improving the quality of  
317 perinatal and infant necropsy examinations: a follow up study. J Clin  
318 Pathol. 1998 Nov;51(11):850-3.
- 319 109. Vujanié GM, Cartlidge PH, Stewart JH, Dawson AJ. Perinatal and  
320 infant postmortem examinations: how well are we doing? J Clin Pathol.  
321 1995 Nov;48(11):998-1001.
- 322 110. Watterberg KL. Adrenocortical function and dysfunction in the fetus  
323 and neonate. Semin Neonatol. 2004 Feb;9(1):13-21.
- 324 111. Wigglesworth JS. Classification of perinatal deaths. Soz  
325 Praventivmed. 1994;39(1):11-4.
- 326 112. Wigglesworth JS. Hemopoietic and lymphoreticular systems. In:  
327 Perinatal Patology. Philadelphia. Saunders Company; 1996. p. 366-80.
- 328 113. Wigglesworth JS. The liver and biliary system. In: Perinatal Patology.  
329 Philadelphia. Saunders Company; 1996. p. 275-91.

- 330 114. Williams MA. Quantitative methods in biology. Amsterdam:  
331 Elsevier/North-Holland Biomedical Press; 1977. p.233.
- 332 115. Wood GW. Macrophages in the thymus. *Surv Immunol Res.*  
333 1985;4(3):179-91.
- 334 116. Yamauchi A, Minakami H, Ohkuchi A, Usui R, Idei S, Sato I. Causes  
335 of stillbirth: an analysis of 77 cases. *J Obstet Gynaecol Res.* 1999  
336 Dec;25(6):419-24.
- 337 117. Zago AFR, Paravidine LM, Siqueira LMS, Balbão LM, Reis MA,  
338 Castro ECC. Comparative study between foot length and other methods  
339 of gestational age determination in the newborn. *Pediatr Mod*  
340 2000;36:388– 92.
- 341 118. Zhao H, Poon AM, Pang SF. Pharmacological characterization,  
342 molecular subtyping, and autoradiographic localization of putative  
343 melatonin receptors in uterine endometrium of estrous rats. *Life Sci.*  
344 2000 Mar;66(17):1581-91.