

# Diagnóstico pré-natal: retrospectiva

Luz Mery Bernal, PhD<sup>1,3</sup>

Greizy López, PhD<sup>2,3</sup>

1. PhD em Ciências com ênfase em genética. Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

2. PHD en Genética de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

3. Docente - investigadora Grupo BIOINNOVA Escuela de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional Abierta y a Distancia.

Correspondencia: luz.bernal@unad.edu.co

Recibido: 12/03/2014 Aceptado: 04/06/2014

## Resumo

O Diagnóstico Pré-Natal (DPN) é um conjunto de técnicas destinado a investigar a saúde fetal ainda no período de vida intrauterina. É dirigido principalmente a casais com risco aumentado de gerar uma criança com uma anomalia genética ou congênita. Seu objetivo fundamental pressupõe a identificação de anomalias cromossômicas, malformações, doenças metabólicas mendelianas e outras alterações circunstancialmente adquiridas durante a gestação e com repercussões sobre o feto (1-4).

O DPN tem sido usado como um método formal de diagnóstico por mais de 45 anos, passando por diferentes fases no seu desenvolvimento. A história do DPN está relacionada com a introdução e o aprimoramento de novas técnicas laboratoriais e diagnósticas. O primeiro passo para o conhecimento do compartimento feto-placentário foi dado por Bevis, em 1952, quando realizou uma amniocentese com fins propedêuticos: o estudo da doença hemolítica fetal. Nos seguintes anos, vários pesquisadores demonstraram que é possível determinar o sexo fetal mediante o estudo da cromatina sexual em células de líquido amniótico (5-8). O desenvolvimento das técnicas citogenéticas (9) levou a Fuchs e Philips (10) a demonstrar a viabilidade de se cultivar células obtidas no Líquido Amniótico (LA) para posterior análise do cariótipo fetal. Desse modo, obtiveram-se os primeiros cariótipos fetais a partir de células de LA entre 1965 e 1967 (11-13). Valenti (14) e Nadler (15) descreveram o primeiro DPN de uma anomalia cromossômica: a trissomia do cromossomo 21. No mesmo ano, diagnosticou-se uma anomalia por erro inato do metabolismo (galactosemia) mediante a análise do LA (15). Quatro anos depois, altas dosagens de alfa-fetoproteína (AFP) no soro materno foram correlacionadas com o aumento da probabilidade de ocorrência de erros no fechamento do tubo neural (16).

**palavras-chave:** anomalia congênita, anomalia cromossômica, diagnóstico pré-natal, retrospectiva, vida intrauterina..

### Resumen

El Diagnóstico Prenatal (DPN) es un conjunto de técnicas destinadas a establecer un diagnóstico fetal aún en el periodo de vida intra-uterina. Está dirigido principalmente a parejas con mayor riesgo de presentar un embarazo de un hijo con una anomalía genética o congénita. Su objetivo fundamental es lograr la identificación de anomalías cromosómicas, malformaciones, enfermedades metabólicas, mendelianas y otras alteraciones eventualmente adquiridas durante la gestación y con repercusiones sobre el feto. El DPN ha sido usado como un método formal de diagnóstico desde hace más de 45 años, pasando por las diferentes fases de su evolución. Esta revisión describe estas fases abordando las realizaciones científicas que permitieron su implementación y mejoramiento continuo.

**Palabras clave:** anomalía congénita, anomalía cromosómica, diagnóstico pré-natal, retrospectiva, vida intrauterina..

### Abstract

Prenatal diagnosis is a set of techniques intended to establish a fetal diagnosis even in the period of intrauterine life. It is aimed primarily at couples with higher risk of having a genetic or congenital abnormal pregnancy. Its basic aim is to ensure the identification of chromosomal anomalies, malformations, metabolic and Mendelian diseases, and other alterations eventually acquired during pregnancy which have an impact on the fetus. Prenatal diagnosis has been used as a formal diagnosis method for more than 45 years, going through the various stages of its evolution. This text revises these phases by addressing the scientific and technological developments that have led to its implementation and continuous improvement.

**Key Words:** congenital abnormal pregnancy, genetic abnormal pregnancy, period of intrauterine life, prenatal diagnosis, retrospective analysis.

Os pesquisadores citados introduziram um conhecimento essencial para a capacitação em uma metodologia útil na realização de análises bioquímicas e citogenéticas em tecidos de origem fetal. No entanto, a coleta do material destinado às análises diagnósticas pré-natais era um grande obstáculo para uma maior compreensão e delimitação das patologias fetais. Devido à ausência de parâmetros seguros que determinassem o melhor local para a inserção da agulha, não é difícil imaginar o risco acarretado por uma punção da câmara amniótica sem auxílio de ultrassonografia. Um grande passo na viabilização do diagnóstico pré-natal foi dado, em 1958, por Ian Donald, Tom Brown e John MacVivar. Os três dedicaram-se a estudar a aplicação da ecografia visando à visualização de estru-

turas internas do corpo. No final dos anos 1960, a definição das imagens obtidas por ultrassom foi ampliada com a introdução de um equipamento capaz de fornecer imagens em escala de cinza. Na década de 1970, foram introduzidos os aparelhos de ultrassonografia em tempo real (17-18). A partir desse momento, foi possível acompanhar todo o procedimento de coleta de tecidos fetais pela ultrassonografia; com isso, a coleta de LA tornou-se mais segura. A introdução do termo “diagnóstico pré-natal” data dessa época.

A década de 1980 foi marcada pela preocupação em torno de critérios de seleção das gestantes sob risco de apresentar um feto com uma anomalia congênita, especialmente nos casos de

maior incidência na população de recém-nascidos (como a síndrome de Down (SD) e os erros de fechamento de tubo neural (EFTN). Nesse sentido, diversos testes de triagem para o rastreamento populacional foram desenvolvidos. Em 1984, vários autores encontraram uma associação entre a síndrome de Down e níveis de AFP no sangue materno abaixo da média (18). Concluiu-se que a combinação da idade materna com os níveis da AFP detectava de 25% a 33% dos casos de SD, com 5% de falsos-positivos. A descoberta desta associação impulsionou a busca por outros potenciais marcadores bioquímicos passíveis de utilização no rastreamento das aneuploidias fetais. Bogart et al (19) descreveram a associação entre níveis séricos elevados de gonadotrofina coriônica humana (hCG) na mãe e aneuploidia fetal. Segundo Wald et al. (20), a utilização da idade materna em associação com os níveis de hCG identificaria até 60% dos fetos com SD, com 6,7% de falsos-positivos. Canick et al (21) analisaram um terceiro marcador, o estriol não conjugado ( $uE_3$ ). Em baixos níveis, o  $uE_3$  relacionava-se à síndrome de Down. Alguns estudos avaliaram a combinação dos três marcadores com a idade materna. Observou-se que é possível a detecção de mais de 67% dos fetos afetados pela SD, com 7,2% de falsos-positivos (20-26). Desde então, têm-se utilizado a análise que combina o risco relativo à idade materna com a dosagem de AFP, hCG e  $uE_3$  em amostras de soro materno no segundo trimestre de gravidez (entre a 14ª e a 20ª semana gestacional). Observou-se que níveis reduzidos de AFP, hCG e  $uE_3$  estão associados a gestações afetadas por trissomia do cromossomo 18; baixos níveis de AFP e  $uE_3$  e níveis elevados de hCG associam-se a gestações com feto acometido por SD. Haddow et al (27) descreveram a associação no segundo trimestre de gestação entre níveis séricos elevados de no soro materno de Inibina A e aneuploidias fetais (SD e trissomia 18).

A maioria das publicações anteriores enfatizou a necessidade da dosagem de outros marcadores

bioquímicos no soro materno, porém, no primeiro trimestre da gestação. Consideram-se marcadores apropriados a proteína plasmática associada à gravidez (PAPP-A) e a fração  $\beta$  (total ou livre) da hCG (22-25). Wald et al. (26), ao estudar a sensibilidade e a especificidade dos dois marcadores (em associação com a idade materna), encontraram um valor de 62% para a detecção da SD (5% de falsos-positivos). A variabilidade da concentração de PAPP-A no soro de gestantes com feto acometido por síndrome de Down é menor nas semanas de gestação 8 - 10. Recomenda-se a semana 10 para sua medida (24).

Como já foi afirmado, a introdução da ultrassonografia no DPN permitiu uma melhor visualização do feto, facilitando a realização dos procedimentos invasivos e a detecção precoce de malformações. Além de ser utilizada para fins diagnósticos, a ultrassonografia é também utilizada no rastreamento de anomalias fetais e cromossômicas. Em 1988, Jones (28) enfatizou que a maioria dos fetos com alterações citogenéticas possui defeitos estruturais externos ou internos, que poderiam ser detectados por meio da ultrassonografia morfológica. Vários marcadores ultrassonográficos foram descritos, entre eles, o edema de nuca, o higroma cístico, a onfalocel e os defeitos cardíacos (29-31). Tais marcadores sinalizam patologias fetais em uma grande proporção dos casos. Por exemplo, se o higroma cístico não regride até a 18ª semana, há uma probabilidade superior a 90% de que o feto esteja acometido por alguma doença (seja cromossômica ou não).

A translucência nucal (TN), espaço preenchido por líquido (linfa) na região que circunda a coluna cervical entre a pele e o tecido subcutâneo, apresenta uma espessura mensurável. Acredita-se que o aumento ou a diminuição da espessura da TN, em comparação com a variação normal observada na população, esteja relacionado às alterações causadas no equilíbrio hemodinâmico do feto. Algumas pesquisas têm demonstrado que fetos que apresentam alterações cromossômicas

como trissomia do cromossomo 21, demoram mais para amadurecer o seu sistema linfático e, por isto, tendem a ter uma maior quantidade de linfa, aumentando a TN. Quando a espessura da TN encontra-se aumentada no primeiro trimestre, há um fator de risco para a síndrome de Down e outras anomalias cromossômicas como trissomia do cromossomo 13 e 18 (29-33).

A utilização conjunta da TN e dos marcadores bioquímicos de primeiro trimestre têm proporcionado resultados interessantes no rastreamento de algumas anomalias cromossômicas. De Biasio et al (34) observaram uma sensibilidade de 85% na detecção de SD, com 3,3% de falsos positivos. Para a mesma síndrome, Sabriá et al (35) verificaram uma sensibilidade de 75%, com 7,5% de falsos positivos. Considerando em conjunto as anomalias cromossômicas encontradas (trissomia do cromossomo 21 e monossomia do cromossomo X), a sensibilidade foi de 83,3% e a taxa de falsos positivos foi de 7,3%. Krantz et al (36) reportaram uma taxa de detecção de trissomia 21 do 87,5% com 4,5% de falsos positivos em mulheres menores de 35 anos e uma taxa de detecção do 92% com 14,3% de falsos positivos em mulheres com idades maiores ou iguais a 35 anos. Para a trissomia 18, reportaram uma taxa de detecção de 100% com 0,4 – 1,4% para mulheres < de 35 anos e ≥ de 35 anos respectivamente. Wapner et al (37) reportaram, no primeiro estudo multicêntrico dos Estados Unidos, uma taxa de detecção para trissomia 21 de 78,7% com 5% de falsos positivos; para trissomia 18, a taxa de detecção foi de 90,9% com 2% de falsos positivos.

Depois de vários estudos multicêntricos e randomizados conclui-se que a triagem de anomalias congênicas deve ser realizada antes da semana 20 de gestação, independentemente da idade materna. As semanas 10 - 11 e a 15 - 16 são as mais adequadas para a triagem no primeiro e no segundo trimestre, respectivamente. A eleição dos marcadores depende de vários fatores, incluindo a idade gestacional, o número de fetos, a história clínica

obstétrica prévia, a disponibilidade da medida da TN, a sensibilidade e limitações das provas, o risco dos procedimentos diagnósticos invasivos e das opções da interrupção da gravidez (24).

O desenvolvimento de novas tecnologias para a identificação de mutações gênicas por meio de técnicas de biologia molecular, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) no diagnóstico genético pré-natal permitiram o diagnóstico de um grande número de distúrbios gênicos em fases precoces da gestação. O número de distúrbios diagnosticáveis, a precisão e a eficácia da análise estão aumentando à medida que novos métodos são criados, novas mutações caracterizadas e os mecanismos de segregação de várias doenças genéticas são compreendidos (38-39).

Uma preocupação constante na área de pesquisa relacionada ao DPN é a redução dos riscos associados à coleta de material destinado à análise. Uma alternativa à coleta de tecidos fetais seria a obtenção de células fetais presente no sangue materno. Bianchi et al (40) demonstraram a existência de células fetais no sangue materno a partir de uma sequência do cromossomo Y, amplificada por PCR. Desde esse tempo, numerosos grupos de trabalho estão pesquisando os procedimentos mais adequados que permitam a separação das células fetais dos glóbulos vermelhos maternos e possam proporcionar células suficientes para a análise genética (41,42). No entanto, o isolamento dessas células - ainda é tecnicamente complexo. Células fetais podem estar presentes no sangue materno em razão de 1:100.000 células maternas ou menos (ou aproximadamente uma por ml de sangue materno). Além do número baixo, outro problema é a permanência de células fetais em circulação maternal após a gravidez. Foi relatada a detecção de DNA nuclear masculino em uma mulher que havia tido seu filho homem 27 anos antes do estudo (43,44). Contudo, na atualidade, os estudos centram-se no DNA fetal livre de células no plasma materno que, por sua vez, representa até um 6,2%

do DNA total presente no plasma materno. A análise do DNA fetal livre de células do plasma materno permite a sexagem fetal em casos de doenças com padrão de herança ligada ao X recessiva, onde apenas os meninos seriam afetados. Acontece do mesmo modo nos casos de Hiperplasia Congênita de Adrenal, uma doença genética com padrão de herança autossômica recessiva (44).

Uma das aquisições proporcionadas pela aplicação da biologia molecular no diagnóstico pré-natal é o Diagnóstico Genético Pré-Implantacional (DGP). Este pode ser considerado uma opção diagnóstica para determinados casais de alto risco genético. Com o DGP, o estudo genético de gametas e/ou embriões e a seleção daqueles não afetados para posterior transferência foram possíveis. O uso concomitante das técnicas de reprodução assistida e de biologia molecular como FISH e PCR permite diagnosticar doenças genéticas a partir de um ou dois blastômeros biopsados do embrião em estágio de clivagem, antes da transferência para o útero materno (45-46). Utiliza-se PCR no diagnóstico de doenças autossômicas recessivas (como fibrose cística, síndrome de Lesch-Nyhan, doença de Tay-Sachs,  $\beta$ -talassemia, por exemplo), autossômicas dominantes (síndrome de Marfan, doença de Huntington e distrofia miotônica, por exemplo) e ligadas ao cromossomo X, como a distrofia muscular de Duchenne e síndrome do X-frágil (47-48). A FISH possibilita conhecer e selecionar o sexo embrionário quando os pais são portadores de genes responsáveis por doenças ligadas ao cromossomo X. Afora isso, a técnica é utilizada na identificação do número de cópias de determinado cromossomo. Vários trabalhos descrevem a utilização da FISH multicolorida no DGP, que permite a identificação de cinco ou seis cromossomos diferentes de forma simultânea em uma mesma hibridação ou até nove cromossomos em dois ciclos de hibridação (45, 49-51). Ulli et al. (52) indicaram que a técnica conhecida como SKY (Spectral Karyotyping) pode ser adaptada para a utilização em núcleos interfásicos. Munné et al. (53), por sua parte, concluíram que uma vez desenvolvida a metodologia apropriada

para obter preparações cromossômicas eficientes de blastômeros isolados, a técnica de SKY poderá ser aplicada para detectar todos os tipos de anomalias cromossômicas (numéricas e estruturais) em uma única célula. Entretanto, para Wells et al. (54), a técnica conhecida como PEP (Primer Extension Preamplification), combinada com a hibridação genômica comparativa (CGH, de Comparative Genomic Hybridization), possibilitaria também a detecção de todos os tipos de anomalia cromossômica (numéricas e estruturais). Assim, o DNA extraído de um dos blastômeros biopsados de um mesmo embrião pode ser submetido à amplificação genômica aleatória mediante a PEP e, portanto, pode ser hibridado com preparações cromossômicas normais mediante CGH, permitindo assim a detecção de qualquer tipo de anomalia cromossômica.

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novas tecnologias moleculares permitiu que o DPN avançasse a uma velocidade sem precedentes. A inclusão de provas de microarray, como Hibridação Genômica Comparativa (CGH-Array), que contem cerca de 60.000 oligonucleotídeos que, por sua parte, representam sequências do genoma humano, permite, pela comparação com o cariótipo, detectar alterações cromossômicas (deleções e duplicações) que não são observadas ao microscópio óptico. Mais recentemente, foi desenvolvida a técnica denominada Sequenciamento de DNA de nova geração (Next Generation Sequencing [NGS]), também conhecida como sequenciamento em massa paralela, do inglês Massive Parallel Sequencing (MPS). Esta “nova geração” melhorou drasticamente nos últimos anos, conseguindo que o número de bases que se podem sequenciar tenha crescido exponencialmente. Além disso, o sequenciamento em massa tem o potencial de detectar todos os tipos de variação genômica num único experimento, incluindo variantes de nucleotídeo único ou mutações pontuais, pequenas inserções e deleções, assim como variantes estruturais equilibradas (inversões e translocações) e desequilibradas (deleções ou duplicações) (49,55).

## Amniocentese

A amniocentese, o mais antigo procedimento de coleta do DPN, consiste em retirar uma amostra do líquido contido no interior da cavidade cório-amniótica mediante uma agulha inserida pela parede abdominal. O material obtido pode ser submetido à análise citogenética, bioquímica ou molecular. Em geral, o exame é realizado a partir da 15ª semana gestacional (amniocentese tradicional); no entanto, pode ser realizado entre a 12ª e a 14ª semana de gestação (amniocentese precoce) (56). Alguns centros realizaram a amniocentese a partir da 11ª semana gestacional (57-60) e outros a partir da 10ª semana gestacional (61-64).

## Aspectos históricos

Em 1919, Henckel foi o primeiro a empregar a amniocentese transabdominal com fins propedêuticos. Deve-se a O'Menees (1930), a utilização do procedimento na amniografia. Albano (1933) utilizou a amniocentese no diagnóstico de morte fetal intrauterina; no mesmo ano, Dieckman avaliou o volume amniótico pelo vermelho congo (65). Bevis (66) utilizou-a para analisar o teor de bilirrubina presente no LA. O método ganhou importância a partir da década de 1950, quando a espectrofotometria de LA foi instituída no seguimento de gestantes aloimunizadas pelo fator Rh (65). A partir de 1966 ficou aberto o caminho para os estudos citogenéticos do feto humano. Grandes séries foram publicadas (67-69) relatando o diagnóstico da maioria das anomalias cromossômicas. Em 1970, Nadler e Gerbie (70) resumiram a experiência inicial na execução da amniocentese genética em 142 pacientes e, no mesmo ano, Littlefield (71) demonstrou que o exame apresentava precisão diagnóstica e risco relativamente baixo. Nos anos seguintes, vários pesquisadores relataram a possibilidade do DPN numa ampla variedade de alterações cromossômicas e metabólicas. A partir da década de 1980, graças aos avanços da ultrassonografia, a AT se tomou a técnica preferencial em rotina diagnóstica devido à simplicidade, segurança e confiabilidade dos resultados.

## Líquido amniótico

O LA obtido por amniocentese é um meio complexo proveniente tanto da mãe como do feto. Na cavidade amniótica, o LA encontra-se em renovação constante e apresenta importantes variações de composição e volume no decorrer da gravidez. Dentre suas funções estão a proteção do feto contra traumatismos, garantia de espaço para movimentação corporal, manutenção da temperatura e auxílio no desenvolvimento pulmonar e renal. Por isso, é importante a existência de um volume adequado de LA para o desenvolvimento normal do feto (65,72).

Especulações a respeito do LA são antigas. Já no século V A.C., Hipócrates sugeriu que o LA era produto da urina fetal. Uma das primeiras revisões sobre os componentes do LA foi efetuada por Uyeno, em 1919, com dados adicionais para íons inorgânicos e compostos orgânicos. Nas décadas seguintes, as publicações apresentavam análises químicas comparando o LA com a urina e o sangue. Em 1927, Zangeimeister propôs uma tabela para estabelecer a relação entre o volume de LA e a idade gestacional. Em 1933, estudando a fisiologia ovular, Albano realizou uma amniocentese para calcular o volume de LA. Em 1961, Harvey propôs que o feto deveria participar da renovação do fluido amniótico através da deglutição (73). Nas três últimas décadas, o desenvolvimento de métodos de análise bioquímica, estudos citológicos e de cultura celular, expandiu os conhecimentos sobre a inter-relação mãe-feto-LA.

A regulação do volume do LA depende da interação entre o feto, a placenta e a mãe. A quantidade de LA está intimamente relacionada com o estágio da gestação. Entre a 10ª e a 20ª semana, a composição assemelha-se ao plasma sanguíneo do feto. Estimativas realizadas por diversos métodos permitem calcular o volume esperado de LA nas várias semanas de gestação. De acordo com Elejalde et al. (74), o volume total de LA encontrado em média é de 30 ml, 70 ml e 200

ml na 10<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> semana de gestação, respectivamente. Para fins de DPN, uma redução de até 10% do volume total é considerada inócua para o feto (75). Alguns autores propõem a retirada de um ml de LA na amniocentese por semana de idade gestacional (76-78). No entanto, autores como Eiben et al. (59) e Tharmaratnam et al. (64) ressaltam a importância de minimizar a quantidade de LA removido na AP. Eles concluíram que a remoção de aproximadamente 12 ml de LA em períodos precoces da gravidez (antes da 12<sup>a</sup> semana) poderia aumentar a taxa de perda fetal e causar alterações respiratórias e ortopédicas nos conceitos.

Em gestações normais, o LA é translúcido e apresenta uma coloração amarela clara nos dois primeiros trimestres da gestação. A partir do início do terceiro trimestre fica ainda mais claro e torna-se opaco próximo ao final da gestação devido à descamação da pele fetal e ao muco produzido pelas glândulas sebáceas. Antes da 24<sup>a</sup> semana, o LA apresenta pH em torno de 7,25; após esse período, o pH diminui em consequência da participação urinária na manutenção do volume (72). O LA, constituído basicamente por água (em torno de 98 a 99%), apresenta compostos tais como glicose, bilirrubina, creatinina, ureia, ácido úrico, proteínas (albumina, imunoglobulina G, alfa-1-antitripsina, transferrina, glicoproteína ácida e AFP são exemplos comuns), lipídios (por exemplo, esfingomielina, lecitina e fosfatidil-glicerol), hormônios e enzimas (por exemplo, gama glutamyl transferase, leucino aminopeptidase, fosfatase alcalina). Também são encontrados diversos íons, tais como sódio, cloro, bicarbonato, fósforo, cálcio, magnésio e potássio. A concentração de vários desses componentes é utilizada para inferir o estado de saúde fetal, a partir de indicações consolidadas. Em relação aos íons, apenas a concentração do sódio apresenta clara tendência de diminuir à medida que a idade gestacional progride. Essa diminuição resulta do amadurecimento dos túbulos renais e do consequente aumento da capacidade de reabsorção do sódio, bem como da queratiniza-

ção do tegumento conceitual. Assim, o sódio presente no LA representa um importante parâmetro de avaliação das funções renais. Quanto aos íons restantes, não há nenhum padrão que permita estabelecer relações funcionais motivando as variações aparentemente aleatórias de concentração no decorrer da gravidez. De modo semelhante, os lipídios supracitados permitem inferir a situação de maturidade do sistema respiratório (79). As enzimas gama glutamyl transferase, leucino aminopeptidase, fosfatase alcalina têm sido utilizadas no DPN de anomalias do sistema digestivo. Já a acetilcolinesterase, em concentrações elevadas implica maior risco de EFTN ou de disrupção da parede abdominal a partir da 12<sup>a</sup> semana gestacional. A concentração de alguns hormônios tem demonstrado também uma correlação com anomalias intrauterinas. A dosagem da 17-hidroxiprogesterona constitui parâmetro de inferência para hiperplasia congênica da supra-renal. O déficit de biossíntese esteroidiana pode ser detectado pela concentração dos hormônios esteroides de origem supra-renal ou gonadal (80).

Atualmente, um grande número de doenças mendelianas já pode ser diagnosticado pela análise bioquímica do LA, com técnicas de cromatografia, espectrofotometria de massa e eletroforese. Pode-se citar, entre outras, erros do metabolismo de carboidratos, mucopolissacaridoses, lipidoses, aminoacidopatias, acidemias orgânicas, anemia hemolítica congênita, síndrome de Lesh-Nyhan e hiperplasia congênita da supra-renal.

O estudo citológico do LA é relevante para o DPN. Dada a dificuldade de se realizar amniocentese como rotina antes da 10<sup>a</sup> semana de gravidez, pouco se conhece acerca dos componentes celulares do LA em períodos mais precoces da gestação. Em um estudo do LA de pacientes cuja idade gestacional variava entre 7 e 11 semanas, encontrou-se uma composição celular totalmente diferente da achada em gestações mais tardias. Sugeriu-se que as células encontradas antes da 12<sup>a</sup> semana de gestação têm as mesmas características daquelas

localizadas entre a endoderme e o mesênquima do saco vitelínico, bem como das células da superfície do cordão umbilical primitivo. Conjecturou-se serem as células, encontradas no LA, derivadas das células hematopoiéticas do saco vitelínico, as quais passariam pela fina membrana dessa estrutura entre a 11<sup>a</sup> e a 12<sup>a</sup> semana de gestação, em direção à cavidade cório-amniótica (81). Entre a 13<sup>a</sup> e a 14<sup>a</sup> semana gestacional, o número de células encontradas no LA é pequeno e, principalmente, de origem membranosa. Na 13<sup>a</sup> semana, ocorre a abertura da membrana anal do feto e o LA começa a circular através do tubo digestivo. Isso permite a passagem de células fetais provenientes da descamação das mucosas para o líquido aumentando a concentração celular. Após esse evento, o polimorfismo celular passa a ser uma característica dominante no LA. A partir de então, a maioria das células provém da descamação das mucosas oral, anal, respiratória, vaginal, epidérmica e funicular. A quantidade de células obtidas entre 16 e 18 semanas é de aproximadamente 10.000/ml, mas a maioria delas não é viável. Depois de cultivados, os tipos celulares distinguíveis são: grandes células epiteliais (células “E”), derivadas provavelmente da pele fetal e das mucosas genito-urinárias; pequenas células epiteliais (células “AF”, do inglês *amniotic fluid*), que são mais abundantes e derivadas fundamentalmente do trofoblasto; fibroblastos (“F”), menos frequentes, mas com grande capacidade de proliferação, derivados da derme fetal e do tecido conjuntivo. Entre a 17<sup>a</sup> e a 20<sup>a</sup> semana de gestação inicia-se a queratinização da pele fetal, que pode dificultar o crescimento das células em cultura (75-84).

### Indicações para o exame

As principais indicações para a realização da amniocentese para o diagnóstico citogenético são:

1. Idade materna avançada ( $\geq 35$  anos)
2. Pais portadores de rearranjos cromossômicos equilibrados
3. Filho anterior apresentando malformação
4. Filho anterior portador de alguma anomalia cromossômica

5. Determinação do sexo fetal por risco de doença ligada ao cromossomo X, para estudos moleculares posteriores
6. Presença de marcadores ultrassonográficos sugestivos de aberração cromossômica fetal
7. Malformações observadas em ultrassonografia de rotina
8. Ansiedade

Entre as indicações não primordialmente citogenéticas estão a determinação bioquímica para doenças metabólicas, a análise molecular, a pesquisa de infecções por rubéola, toxoplasmose, citomegalovírus e a determinação de paternidade (85).

### Procedimento

A amniocentese (precoce e tradicional) pode ser realizada em regime ambulatorial, após exame ultrassonográfico detalhado; o recurso da ultrassonografia deve estar também disponível durante o procedimento de coleta para a determinação não só do local de inserção da agulha, como também da orientação da mesma dentro da câmara, de modo a atingir um ponto onde haja maior quantidade de LA, evitando assim lesões ao feto e perfurações da placenta. A área onde o cordão umbilical se insere na placenta deve ser sempre evitada, pois existe a possibilidade de se perfurar um dos grandes vasos da placa coriônica. Sob orientação ultrassonográfica, uma agulha de calibre 20 ou 22 gauge (G) é introduzida através da parede abdominal e uterina até o interior da cavidade amniótica. Através da seringa conectada à agulha aspira-se um volume de aproximadamente 20 ml para a AT; no caso da AP, calcula-se um ml por semana gestacional para efeitos de coleta (86,87). Não há necessidade de se administrar anestesia local. Vários estudos relatam dor mínima ou ausência de dor nas pacientes durante e após o procedimento (88). O estudo de Dorfer et al. (89) abordou a algisia em mulheres que realizaram a AP. Em uma escala de algisia, variando de zero a dez, encontrou-se uma média de 2,9, ou seja, a sensação de dor durante o procedimento foi considerada baixa. Caso a tentativa inicial de se obter o LA seja mal sucedida, há a opção



de se inserir uma segunda agulha, puncionando-se outro local. Não mais do que duas inserções devem ser realizadas no mesmo dia; se não houver sucesso, deve-se repetir uma semana depois. Vários estudos relatam aumento de perdas fetais associadas a múltiplas inserções (90,91). Quando a placenta apresenta inserção anterior, a punção pode ocasionalmente ser transplacentária. Alguns autores sugerem uma taxa maior de complicações associadas a este procedimento (92,93). No entanto, outros autores relatam que a inserção anterior da placenta e, conseqüentemente, a punção transplacentária, não aumenta a taxa de complicações quando profissionais experientes realizam o procedimento. Hills et al. (94) analisaram uma série de 562 amniocenteses e verificaram que a taxa de perda fetal no grupo com punção transplacentária não foi estatisticamente significativa comparada ao grupo em que a punção não havia sido transplacentária. Crane e Kopta (95) realizaram 1.000 amniocenteses sob orientação ultrassonográfica, evitando a placenta, sempre que possível, ou tentando realizar o procedimento perfurando a região mais delgada desse anexo fetal. Esses autores observaram que a localização da placenta não estava associada a taxas maiores de perda fetal. No estudo de Bombard et al. (96), 1.000 pacientes foram avaliadas. Os procedimentos foram realizados por operadores experientes e se examinaram as taxas de perda após amniocentese placentária e não-placentária. Um total de 518 pacientes apresentou placenta anterior e em 306 mulheres a agulha penetrou através da placenta. Todas as gravidezes foram acompanhadas prospectivamente até o momento do parto. Os autores concluíram que é uma taxa de perda semelhante tanto para os grupos transplacentários quanto para os não transplacentários. Bravo et al. (1995) revisaram 380 casos de amniocentese realizada antes da 15ª semana de gestação; em 38,7% dos casos a punção havia sido transplacentária. Os autores concluíram que as taxas de perda gestacional foram semelhantes nos grupos. Zolnierczyk et al. (97), estudando amostras de 183 AP realizadas entre a 12ª e a 14ª semana de gestação (49 casos transplacentários), encontra-

ram aumento na incidência de sangramento após a AP transplacentária. Não foram observadas perdas gravídicas, nem outras complicações serias nas pacientes. Concluíram, fundamentados em tais resultados, não haver nenhuma razão para evitar a via transplacentária na amniocente. Tharmaratnam et al. (98) estudaram as complicações associadas a procedimentos transplacentários. Foram realizadas 401 AP entre a 10ª e a 14ª semana gestacional. No grupo transplacentário (148 casos), houve maior incidência de sangramento após a coleta (diferença significativa). Apesar desses resultados, não houve diferença na taxa de perda fetal entre os dois grupos, nem em relação às intercorrências de perda de LA e cólicas. Igualmente aos achados de outros trabalhos, os autores concluem que a AP transplacentária é segura e sem riscos aumentados de complicações.

Contudo, a AT apresenta algumas limitações por ser realizada no segundo trimestre de gestação. Adicionalmente, a obtenção dos resultados citogenéticos pode levar, em média, duas semanas. Caso o resultado revele alguma alteração cromossômica no feto, a gestação pode estar num período avançado para uma eventual interrupção, causando complicações obstétricas e psicológicas para a gestante.

Uma alternativa de diagnóstico no primeiro trimestre de gestação é a coleta de Amostra de Vilosidades Coriônicas (AVC), introduzida em 1968 por Hahneemann e Mohr (99). A AVC pode ser obtida por via transcervical entre a 10ª e a 11ª semana de gestação ou ainda pela via transabdominal a partir da 11ª semana até o início do terceiro trimestre de gestação. Sua principal vantagem sobre a AT é permitir resultados diagnósticos em um estágio inicial da gravidez, minimizando os complexos fenômenos psicológicos associados ao diagnóstico pré-natal (100).

A eficácia de cada uma dessas técnicas de diagnóstico tem sido objeto de estudos colaborativos em diferentes países na tentativa de compará-las. Os parâmetros analisados dizem respeito

principalmente aos riscos e complicações técnicas associadas, tais como incidência de perdas fetais, dificuldades na análise das preparações, falha nas culturas, qualidade das preparações cromossômicas e contaminação por células maternas (CCM).

Um dos aspectos estudados com mais frequência é a ocorrência de mosaicismo cromossômico em AVC. A principal dificuldade diz respeito ao reconhecimento das linhagens celulares anormais de origem não fetal e sua interpretação. A frequência de mosaicismo em AVC varia de 0,7% (101) a 2,4% (102,103); portanto, é muito superior às taxas de 0,1% (104) a 0,31% (105) encontradas em amniocentese. A maioria do mosaicismo descrito em AVC é confinado ao tecido placentário e não é representativo do cariótipo fetal. Sua interpretação e significado clínico têm sido motivo de controvérsia. Por outro lado, enquanto o mosaicismo encontrado na amniocentese é confirmado no feto em mais de 70% dos casos, na AVC só se confirma em 5 a 25% dos casos (103). A CCM no tecido fetal estudado pode levar também a erros diagnósticos e envolve aproximadamente 0,25% a 1% das amostras de LA (106) e 3% das culturas de AVC (106-108).

### Sumário e conclusões

A partir da segunda metade do século passado, uma série de realizações científicas permitiu o surgimento do diagnóstico pré-natal na área médica. O primeiro procedimento de coleta de células fetais para o estudo do cariótipo foi a AT, realizada após 15 semanas de gestação. Além de ser um procedimento de baixo risco, proporciona suficiente material para a análise citogenética do feto e os resultados obtidos apresentam alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico pré-natal. Contudo, esse diagnóstico só é realizado no segundo trimestre, dificultando decisões reprodutivas que, por vezes, demandam urgência.

A introdução da coleta de AVC veio ao encontro da demanda por um diagnóstico pré-natal no primeiro trimestre. Pode se dar por via transabdominal (após 11 semanas gestacionais) ou transcervical (a partir da 10ª semana). Por se tratar de tecido placentário, o achado de mosaico em células cultivadas a partir de AVC demanda uma contra checagem. Contudo, a coleta de AVC é a que proporciona os resultados mais precoces entre os exames invasivos mais utilizados no diagnóstico citogenético pré-natal.

As principais indicações para a realização do diagnóstico citogenético pré-natal são a idade materna avançada (> 35 anos), a existência de rearranjos cromossômicos equilibrados em um dos progenitores, filho anterior apresentando malformação, filho anterior portador de alguma anomalia cromossômica, necessidade de determinar o sexo fetal por risco de doença ligada ao cromossomo X, presença de marcadores ultrasonográficos sugestivos de aberração cromossômica fetal, malformações observadas em ultrasonografia de rotina e ansiedade materna. De modo geral, a frequência de anomalias cromossômica encontradas em populações estudadas correlaciona-se com as indicações para o exame, embora haja exceções.

Diversos estudos abordaram a composição, propriedades e aspectos citológicos do líquido amniótico, bem como as mudanças que este vai apresentando no decorrer da gestação. Esse conhecimento é utilizado em várias abordagens do diagnóstico pré-natal, inclusive a da citogenética.

Assim como em outros procedimentos de coleta de tecidos fetais, a ultrasonografia é hoje uma ferramenta indispensável no DPN. Além de ser utilizada para orientar os operadores antes, durante e após o procedimento, a ultrasonografia é utilizada tanto no diagnóstico como no rastreamento de anomalias fetais.

## Referencias Bibliográficas

- Milunsky A. Genetic Disorders and The fetus: Diagnosis, Prevention and Treatment. Johns Hopkins University Press.1992; 3th Ed. Baltimore.
- Pinto Jr.W. Diagnóstico pré-natal. Ciência & Saúde Coletiva. 2002; 7(1):139-157.
- Castro I. El diagnóstico prenatal de defectos cromosómicos en Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 2004; 52 (3): 545-549.
- Simpson J.L. Invasive procedures for prenatal diagnosis: Any future left? Best. Pract. Res. Clinical. Obstet. Gynaecol. 2012; 26: 625 – 638.
- Serr D.M., Sachs L, Danon M. Diagnosis of sex before birth using cells from amniotic fluid. Bull. Res. Councl. Isr.1995; 58:137-138.
- Fuchs F., Rus P. Antenatal sex determination. Nature. 1956;177:330.
- James F. Sexing foetuses by examination of amniotic fluid. Lancet.1956; 1:202.
- Makowski E., Prem K., Kaiser I.H. Detection of Sex of fetuses by the incidence of sex chromatin in nuclei of cells in amniotic fluid. Science.1956;123: 542.
- Tjio T.H., Levan A. The chromosome number of man. Hereditas. 1956;42:1.
- Fuchs F., Philip J. Possibility of antenatal examination of fetal chromosome. Nord. Med. 1963; 69:572.
- Steele M.W., Breg W.R. Chromosome analysis of human amniotic fluid cells. Lancet. 1966;1:383-386.
- Thiede H.A., Creasman W.T., Metcalfe S. Antenatal analysis of the human chromosomes. Am. J. Obstet. Gynecol. 1966; 94:589.
- Jacobson C.B., Barter R.H. Intrauterine diagnosis and management of genetic defects. Am. J. Obstet. Gynecol. 1967; 99:796.
- Valenti C., Schutta E.J., Kehaty T. Prenatal diagnosis of Down's syndrome. Lancet. 1968; 2:220.
- Nadler H.L. Antenatal detection of hereditary disorders. Pediatrics. 1968; 42:912.
- Brock D.J., Stuclyffe R.G. Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spine bifida. Lancet. 1972; 2:197.
- Woo J. A short history of the developments of ultrasound in obstetrics and gynecology. Disponível na Internet. <http://www.ob-ultrasound.net/history.html>.2006.
- Merkatz I.R., Nitowsky H.N., Macri J.N., Johnson W.E. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosome abnormalities. Am. J. Obstet. Gynecol. 1984; 148:886-891.
- Bogart M.H., Paudian N.R., Jones O.W. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropine levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities, Prenat. Diagn.1987; 7:623-630.
- Wald N.J., Cuckle H.S., Densen J.W. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. Br. Med. J.1988; 297:883-887.
- Canick J.A., Knight G.J., Palomaki G.E., Haddow J.E., Cuckle H.S., Wald N J. Low second trimester maternal serum unconjugated estriol in pregnancies with Down syndrome. Br. J. Obstet. Gynaecol. 1988; 95:330-333.
- Macintosh M.C., lies R., Teisner B., Sharma K., Chard T., Grudzinskas J.G. Maternal serum human chorionic gonadotrophin and pregnancy-associated plasma protein a markers for fetal Down syndrome at 8-14 weeks. Prenat. Diagn. 1994; 14:203-208.
- Spencer K. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester using free p-hCG and PAPP-A, combined with fetal nuchal translucency thickness. Prenat. Diagn. 2000; 20:91-95.
- Martín Navas I, López Escribano H. Cribado prenatal de anomalías congénitas: Marcadores y estrategias. Ed. Cont. Lab. Clín. 2007; 11:9-18.
- Russo M., Blakemore K. A historical and practical review of first trimester aneuploidy screening. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine. 2014; 19:183-187.
- Wald N.J., George L, Smith D., Densem J.W., Petterson K. Serum screening for Down's syndrome between 8 and 14 weeks of pregnancy. International Prenatal Screening Research Group. Br. J. Obstet. Gynaecol. 1996; 103:407-412.
- Haddow J.E., Palomaki G.E., Knight G.J., Foster D.L., Neveux L.M. Second trimester screening for Down's syndrome using maternal serum dimeric inhibin. A.J Med. Screen. 1998; 5:115-119.
- Jones K.L. Smith's recognizable patterns of human malformation. WB Saunders.1998; 4th ed. London.
- Nicolaidis K.H., Azar G., Byrne D., Mansur C., Marks K. Fetal nuchal translucency: Ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. Br. Med. J. 1992; 304:867-869.
- Johnson M.P., Johnson A., Holzgreve W. First trimester simple hygroma: Cause and outcome. Am. J. Obstet. Gynecol. 1993; 161:156-161.
- Snijders R.J., Johnson S., Sebire N.J., Noble P.L, Nicolaidis K.H. First-trimester ultrasound screening for chromosomal defects. Ultrasound. Obstet Gynecol.1996; 7:216-226.
- Brambati B., Cislighi C., Tului L. First trimester Down's syndrome screening using nuchal translucency: A prospective study in patients undergoing chorionis villus sampling. Ultrasound. Obstet. Gynecol. 1995; 5:9-14.
- Nicolaidis K.H., Snijders R.J., Cuckle H.S. Correct estimation of parameters for ultrasound nuchal translucency screening. Prenat. Diagn., 1998; 18: 519-523.
- De Biasio P, Siccardi M., Volpe G., Famularo L., Santi F., Canini S. First-trimester screening for Down syndrome using nuchal translucency measurement with free beta-hCG and PAPP-A between 10 and 13 weeks of pregnancy-the combined test. Prenat Diagn. 1999; 19:360-363.
- Sabrá J., Cabrero D., Aleixandre R.N., Vila I., Bach C. Cribajes bioquímico y bioquímico-ecográfico de las cromosomopatías en el primer trimestre. Falsos positivos. Prog. Diagn. Prenat., 1999; 11(1):20-26.
- Krantz D.A., Hallahan T.W., Orlandi F, Buchanan P, Larsen J.W., Macri J.N. First trimester Down syndrome screening using dried blood biochemistry and nuchal translucency. Obstet. Gynecol.2000; 96:207-213.
- Wapner R., Thom E., Simpson J.L., Pergament E., Silver R., Filkins K., *et al.* First Trimester Maternal Serum Biochemistry and Fetal Nuchal Translucency Screening (BUN) Study

- Group. First-trimester screening for trisomies 21 and 18. *N. Engl. J. Med.* 2003;349:1405-1413.
38. Gupta G.K., Bianchi D.W. Diagnóstico do DNA para o obstetra praticante. In: *Clínicas Obstétricas e Ginecológicas da América do Norte. Diagnóstico e Tratamento Fetal.* Reece E.A. Interlivros. Rio de Janeiro. 1997; (1).
  39. Sheth F., Sheth H., Pritti K., Tewari S., Desai M., Patel B., and Sheth J. Evolution of Cytogenetics in Disease Diagnosis. *J. Transl. Toxicol.* 2014; 1(1):3-9.
  40. Bianchi D.W., Flint A.F., Pizzimenti M.F., Knoll J.H., Latt S.A. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990; 87(9):3279-3283.
  41. Simpson J.L. Isolating fetal cells in maternal circulation for prenatal diagnosis. *Prenat. Diagn.* 1994; 14:1229-1242.
  42. Mieke W.J., Jansen C., Lindern M., Beug H., Brandenburg H., Wildschut H.I., Wladimiroff J.W., Veld P.A. The use of in vitro expanded erythroid cells in a model system for the isolation of fetal cells from maternal blood. *Prenat. Diagn.* 1999; 19:323-329.
  43. Bianchi DW. Fetomaternal cell traffic, pregnancy-associated progenitor cells, and autoimmune disease. *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2004; 18(6):959-975.
  44. Silveira Ramos E. DNA livre fetal em plasma materno e diagnóstico pré-natal não invasivo. *Ver. Latino-am. Enfermagem.* 2006; 14(6).
  45. Carrera M., Boada M., De la Iglesia C., Barri P.N., Veiga A. Avances en diagnóstico citogenético preimplantacional. *Prog. Diagn. Prenat.* 1998; 10(3):123-133.
  46. Wells D., Kaur K., Grifo J., Glassner M., Taylor J., Fragouli E., Munne S. Clinical utilization of a rapid low-pass whole genome sequencing technique for the diagnosis of aneuploidy in human embryos prior to implantation. *J. Med. Genet.* 2014; 51:553-562.
  47. Handyside A.H. Clinical evaluation of preimplantation genetic diagnosis. *Prenat. Diagn.* 1998;18:1345-1348.
  48. Wells D., Sherlock J.K. Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification. *Prenat. Diagn.* 1998;18:1389-1401.
  49. Stern HJ. Preimplantation Genetic Diagnosis: Prenatal Testing for Embryos Finally Achieving Its Potential. *J. Clin. Med.* 2014; 3:280-309.
  50. Munné S., Magli C., Bahce M., Fung J., Legator M., Morrison L., Cohert J., Gianaroli L. Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat. Diagn.* 1998; 18:1459-1466.
  51. Carrera M., Boada M., De la Iglesia C., Barri P.N., Veiga A. Análisis citogenético en embriones preimplantacionales humanos. *Prog. Diagn. Prenat.* 1999; 11(1):9-19.
  52. Ulli H., Weier G., Fung J., Dandekar P., Hyun W., Pedersen R.A. Spectral imaging in preconception/preimplantation genetic diagnosis (PGD) of aneuploidy: Multicolor, multi-chromosome screening of single cells. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1997; 55:150-159.
  53. Munné S., Márquez C., Janisch C. Use of spectral image analysis for chromosome enumeration in polar bodies, oocytes and metaphase-stage blastomeres. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1997; 14:459-464.
  54. Wells D., Sherlock J.K., Handyside A., Adinolfi M., Delhanty J. Whole genome amplification, quantitative fluorescent PCR, and comparative genomic hybridization (CGH) in single cell. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1997; 14:479-87.
  55. Rodríguez-Santiago B., Armengol L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagn. Prenat.* 2012; 23(2):56-66.
  56. Evans M.I., Johnson M.P., Holzgreve W. Early amniocentesis: What exactly does it mean?. *J. Reprod. Med.* 1994; 39(2):77-78.
  57. Brumfield C.G., Lin S., Conner W., Cosper P., Davis R.O., Owen J. Pregnancy outcome following genetic amniocentesis at 11-14 versus 16-19 weeks gestation. *Obstet. Gynecol.* 1996; 88(1): 114-118.
  58. Johnson J.M., Wilson R.D., Winsor E.J., Singer J., Dansereau J., Kalousek D.K. The Early Amniocentesis Study: A randomized clinical trial of early amniocentesis versus midtrimester amniocentesis. *Fetal. Diagn. Ther.* 1996; 11:85-93.
  59. Eiben B., Hammans W., Hansen S., Trawicki W., Osthelder B., Stelzer A., Jaspers K.D., Goebel R. On the complication risk of Early Amniocentesis versus Standard Amniocentesis. *Fetal. Diagn. Ther.* 1997;12: 140-144.
  60. Sundberg K., Bang J., Smidt-Jensen S., Brocks V., Lundsteen C., Parner J., Keiding N., Philip J. Randomised study of risk of fetal loss related to early amniocentesis versus chorionic villus sampling. *Lancet.* 1997; 350:697-703.
  61. Nicolaides K.H., Brizot M.L., Patel F, Snijders RJ. Comparison of Chorion Villus Sampling and Early Amniocentesis for karyotyping in 1492 singleton pregnancies. *Fetal. Diagn. Ther.* 1996; 11:9-15.
  62. Cederholm M., Axelsson O. A prospective comparative study on transabdominal chorionic villus sampling and amniocentesis performed at 10-13 weeks gestation. *Prenat. Diagn.* 1997; 17(4):311-317.
  63. Daniel A., NG A., Kuah K.B., Reina S., Malafiej P. A study of early amniocentesis for prenatal cytogenetic diagnosis. *Prenat. Diagn.* 1998; 18(1):21-28.
  64. Tharmaratnam S., Sadek S., Steele E.K., Harper M.A., Stewart F.J., Nevin J., Nevin N.C., Doman J.C. Early amniocentesis: Effect of removing a reduced volume of amniotic fluid on pregnancy outcome. *Prenat. Diagn.* 1998; 18:773-778.
  65. Rezende J. *Obstetrícia. 6a Edição.* Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1992.
  66. Bevis D.C.A. The antenatal prediction of hemolytic disease of the newborn. *Lancet.* 1956;1:395.
  67. Jacobson C.B., Barter R.H. Intrauterine diagnosis and management of genetic defects. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1967; 99:796.
  68. Valenti C., Schutta E.J., Kehaty T. Prenatal diagnosis of Down's syndrome. *Lancet.* 1968; 2:220.
  69. Nadler H.L. Antenatal detection of hereditary disorders. *Pediatrics.* 1998; 42:912.
  70. Nadler H.L., Gerbie A.B. Role of amniocentesis in the intrauterine detection of genetic disorders. *N. Engl. J. Med.* 1970; 282:596.
  71. Littlefield J.W. The pregnancy at risk for a genetic disorder. *N. Engl. J. Med.* 1970; 282:627.

72. Carrera J.M. Diagnóstico Prenatal: Genética. Ecografía. Bioquímica y Medicina Fetal. Salvat Editores. Barcelona. 1987.
73. Rosas A. Fisiologia do Sistema Amniótico. In: Delascio D., Guariente A. obstetrícia. Ginecologia. Neonatologia. Sarvier. São Paulo. 1984.
74. Elejalde B.R., de Elejalde M.M., Acuna J.A., Thelen D., Trujillo C., Karrmann M. Prospective study of amniocentesis performed between weeks 9 and 16 of gestation: Its feasibility, risks, complications and use in early genetic prenatal diagnosis. *Am. J. Med. Genet.*1990; 35:188-196.
75. Tejada M.I. Citogenética del líquido amniótico. Posibilidades técnicas, eficiencia y aspectos controvertidos. *Prog. Diagn. Prenat.*1994; 6(2):105-118.
76. Evans M.I., Drugan A., Koppitch F.C., Zador I.E., Sacks A.J., Sokol R.J. Genetic diagnosis in the first trimester: The norm for the 1990s. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1989, 160:1332-1339.
77. Stripparo L, Buscaglia M., Longatti L, Ghisoni L, Dambrosio F, Guemeri S., Rosella F, Lituania M., Cordones M., De Biasio P, Passamonti U., Gimelli G., Cuoco C. Genetic amniocentesis: 505 cases performed before the sixteenth week of gestation. *Prenat. Diagn.*1990; 10: 359-364.
78. Rebello M.T., Gray C.T., Rooney D.E., Smith J.H., Hackett G.A., Loeffler F.E., Horwell D.H., Beard R.W., Coleman D.V. Cytogenetic studies of amniotic fluid taken before the 15th week of pregnancy for earlier prenatal. *Prenat. Diagn.*1991; 11:35-40.
79. Bauk F, Morón A., Novo N., Juliano E., Rodrigues L, Kulay Jr. Estudo comparativo das dosagens de sódio, potássio, uréia, creatinina e ácido úrico no líquido amniótico entre 15-20 semanas e 38-42 semanas. *Rev. Ass. Med. Brasil.* 1996;42(1):7-10.
80. Saito M., Silva L.A., Isfer E.U. Biologia do líquido amniótico. Parte II. In: Isfer E.V., Sanchez R.C., Saito M. *Medicina Fetal. Diagnóstico Pré-natal e Conduta.* Editora Revinter. Rio de Janeiro,1996.
81. Torricelli F, Brizzi L., Bernabei P, Gheri G., Di Lollo S., Nutini L, Lisi E., Di Tommaso M., Cariati E. Identification of hematopoietic progenitor cells in human amniotic fluid before the 12th week of gestation. *It. J. Anat. Embryol.* 1993; 98(2):119-126.
82. Hoehn H., Bryant E.M., Karp L.E., Martin G.M. Cultivated cell from diagnostic amniocentesis in second trimester pregnancies. I. Clonal morphology and growth potential. *Pediatr. Res.*1974; 8:746-754.
83. Schrage R., Böglspacher H., Wurster K. Amniotic fluid cells in the second trimester of pregnancy. *Acta. Cytol.*1982; 26:407.
84. Gosden C. Amniotic fluid cell types and culture. *British Medical Bulletin.*1983; 39(4):348-354.
85. Bernal L.M. Evaluación de la amniocentesis precoz en una institución brasileña de diagnóstico prenatal. *NOVA.*2011; 10(17):11-24.
86. Wilson R.D. Early Amniocentesis: A Clinical Review. *Prenat. Diagn.*1995;15:1259-1273.
87. Reece E.A. Amniocentese genética precoce e nos trimestres intermediarios. Segurança e resultados. In: *Clínicas Obstétricas e Ginecológicas da América do Norte. Diagnóstico e Tratamento Fetal.* Reece E.A. Interlivros. Rio de Janeiro. 1997; 1.
88. Crespigny L, Robinson H.P., Ngu A. Pain with amniocentesis and transabdominal CVS. *Aust. N. Z. Obstet Gynecol.* 1990; 30(4):308-309.
89. Dorfer M., Hausler M., Kainer F. Psychological aspects of pain experience in amniocentesis. *Wien. Klin. Wochenschr.* 1998; 110(18):642-645.
90. Simpson N., Dallaire L, Miller J., Siminovich L, Hammerton J., Miller J., McKeen C. Prenatal diagnosis of genetic disease of Canada; report of a collaborative study. *Can. Med. Ass. J.* 1976; 115:739-745.
91. Aula P., Karjalinen O., Terano N., Vaara L, Seppala M. Safety and accuracy of midtrimester amniocentesis for prenatal diagnosis of genetic disorders. *Ann. Clin. Res.*1979;11: 156-159.
92. Harrison R., Campbell S., Craft I. Risks of fetomaternal hemorrhage resulting from amniocentesis with and without placental localization. *Obstet. Gynecol.*1975; 46:389.
93. Mennuti M., Brummond W., Criombleholme W., Shwartz R. Fetal maternal bleeding associated with genetic amniocentesis. *Obstet. Gynecol.*1980; 55:48.
94. Hills J., Reindollar R., Mc Dondungh P. Ultrasonic placenta localization in relation to spontaneous abortion after midtrimester amniocentesis. *Prenat. Diagn.*1982; 2(4):289-292.
95. Crane J., Kopta M. Genetic amniocentesis: Impact of placental position upon the risk of pregnancy loss. *Am. J. Obstet Gynecol.*1984; 150:813-816.
96. Bombard A., Powers J., Carter S. Procedure related fetal losses in transplacental versus nontransplacental genetic amniocentesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1995; 172:868-872.
97. Zolnierczyk P, Raczynski A., Lisawa J., Chazan B. Early amniocentesis transplacental needle passage safer than nontransplacental?. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand. Supplement.* 1997; 76(167):51.
98. Tharmaratnam S., Sadek S., Steele E.K., Harper M.A., Nevin N.C., Doman J.C. Transplacental early amniocentesis and pregnancy outcome. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*1998; 105(2):228-230.
99. Hahneman N., Mohr J. Genetic diagnosis in the embryo by means of biopsy from extra-embryonic membrane. *Bull. Eur. Soc. Hum. Genet.* 1968; 2:23-29.
100. Gollop T.R., Naccache N.F., De Campos I.M., Pieri P.C. Amostra de Vilo Corial: 1290 casos. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 1993; 15(2):84-87.
101. Kalousek D.K., Dill J.F., Pantzar T., McGillivray B.C., Young S.L., Wilson R.D. Confined chorionic mosaicism in prenatal diagnosis. *Hum. Genet.*1987; 77:163-167.
102. Leschot N.J., Schuring-Blom G.H., Van Prooijen-Knecht A.C., Verjaal M., Hansson K., Wolf H., Kanhai H.H., Van Vugt J.M., Christiaens G.C. The outcome of pregnancies with confined placental chromosome mosaicism in cytotrophoblast cells. *Prenat. Diagn.*1996; 16:705-712.
103. Tabor A., Alfirevik Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnostic techniques. *Fetal. Diagn. Ther.*2010; 27:1-7.
104. Bui T.H., Iselius L., Lindsten J. European collaborative study on prenatal diagnosis: mosaicism, pseudomosaicism and single abnormal cell in amniotic fluid cell cultures. *Prenat Diagn., (Special issue).* 1984; 4:145-162.
105. Hsu L.Y.F., Yu M.T, Richkind K.E., Van Dyke D.L, Crandall B.F., Saxe D.F., Khodr G.S., Mennuti M., Stetten G., Miller W.A., Priest J.H. Incidence and significance of chromosome

- mosaicism involving an autosomal structural abnormality diagnosed prenatally through amniocentesis: A collaborative study. *Prenat. Diagn.* 1996; 16:1-28;
106. Verma R., Kleyman S., Conte R. Chromosomal mosaicisms during prenatal diagnosis. *Gynecol. Obstet. Invest.* 1998; 45:12-15.
107. Lippmann A., Tomkins D.J., Shine J. Canadian multicenter randomized clinical trial of chorionic villus sampling and amniocentesis (final report). On behalf of the Canadian collaborative CVS-amniocentesis clinical trial group. *Prenat. Diagn.* 1992; 12:385-476.
108. Sousa A., Anderson J., Cerveira I., Castedo S., Pereira S. Chorionic Villus Sampling in Hospital S. Teotónio Fetal Medicine Unit. *Acta. Obstet. Ginecol. Port.* 2012; 6(1):8-12.