

## Diagnóstico pré-natal

### Prenatal diagnosis

Walter Pinto Júnior <sup>1</sup>

**Abstract** *This article contains all the methods for pré-natal diagnosis of genetic and chromosomal abnormalities, as well infectious diseases in pregnancy. The author discuss the difference among them and the new tools of molecular biology applied in these diagnoses. At the end there is a description of the technique of pre-implantation diagnosis and its use in vitro fertility laboratories distant as long as 2000 kilometers one from the other.*

**Key words** *Prenatal diagnosis, Pre-implantation diagnosis, Invasive methods, Screening tests, Genetic Counseling*

**Resumo** *O presente artigo apresenta uma descrição de todos os métodos de diagnóstico pré-natal de anormalidades genéticas e cromossômicas, bem como dos relativos a doenças infecciosas na gravidez. O autor discute as diferenças entre eles, e as novas ferramentas da biologia molecular que são aplicadas nesses diagnósticos. Ao final é feita uma descrição da técnica de diagnóstico pré-implantação e de seu uso in vitro em laboratórios de fertilidade situados a mais de dois mil quilômetros um do outro.*

**Palavras-chave** *Diagnóstico Pré-natal, Diagnóstico pré-implantação, Métodos invasivos, Testes de rastreamento, Aconselhamento genético*

---

<sup>1</sup> Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp. Caixa Postal 1.170 13001-970 Campinas SP. geneticamedica@geneticamedica.com.br

### Identificação de famílias e gestantes sob risco de gerar crianças com alterações genéticas

Apesar de existirem algumas doenças genéticas que já podem ser tratadas com grande eficiência, como é o caso de várias aminoacidopatias (fenilcetonúria, acidúria metilmalônica etc.), de alterações do metabolismo dos carboidratos (galactosemia, diabetes etc.) ou de enzimopênias (síndrome adreno-genital, doença de Gaucher etc.), a maioria das doenças genéticas carece, ainda, de terapêutica específica. Por esse motivo a genética, mais do que outras especialidades médicas, tem, por enquanto, uma ação predominantemente preventiva.

A identificação de problemas genéticos pode ser estabelecida pelos antecedentes familiares, nos quais, geralmente, já existe um relato anterior de pacientes com doenças de origem genética. Assim, as seguintes situações anamnéticas podem ter peso importante para suspeitarmos que estamos diante de um casal merecedor de um estudo genético.

- Parente próximo ou filho anterior do casal com anomalias congênitas e/ou retardamento mental.
- Casal que possui parentes com doença seguramente de origem genética.
- Casal em que pelo menos um dos cônjuges é portador de uma doença genética ou de um gene que possa causar uma doença genética.
- Casal que refere parentes portadores de doenças semelhantes, mas que tem dúvidas se é herdada ou não.
- Casal com algum grau de parentesco consanguíneo próximo.
- Casal pertencente a um mesmo grupo racial de risco.
- Casal com esterilidade sem causa aparente.
- Casal ou genitores do casal com história de abortamento habitual/natimortos.
- Casal em que o marido possui mais de 55 anos e/ou esposa, mais de 35 anos.
- Casal em que pelo menos um dos cônjuges foi ou está exposto a radiações.
- Casal em que pelo menos um dos cônjuges foi ou está exposto a produtos químicos diversos, inclusive o uso de drogas ou medicamentos para doenças crônicas.
- Casal em que a esposa gestando tenha tido uma infecção aguda causada por toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus ou parvovirose.
- Casal em que na esposa gestando tenha sido constatado durante o exame ultra-sonográfico,

qualquer alteração anatômica.

- Casal em que na esposa gestando tenha sido constatado alteração no teste de triagem bioquímica sugestivo de aberração cromossômica ou de malformações do tubo neural.
- Casal com grande ansiedade de gerar criança malformada, com retardo mental ou com cromossomopatia.

Antes de abordarmos esses tópicos, parece pertinente tecer algumas considerações, com finalidade didática, a respeito dos diferentes tipos de doenças genéticas.

Por doença genética entende-se qualquer alteração do patrimônio genético, o que abrange todas as alterações gênicas presentes no indivíduo que podem ser transmitidas a gerações futuras, bem como o aumento ou diminuição da quantidade de DNA, seja através de cromossomos inteiros ou por frações dos mesmos, através de deleções, duplicações ou ainda, translocações não equilibradas.

Embora o total do DNA humano possa albergar cerca de 3.000.000 de genes, estima-se que o homem seja portador de apenas 50.000. Esses genes estão distribuídos em duas cópias, não obrigatoriamente idênticos nos 23 pares de cromossomos, dois dos quais sexuais, representados pela notação 46,XX (mulher) e 46,XY (homem) e ainda pelo DNA mitocondrial transmitido apenas pela mulher. A distinção entre cada par é feita, ainda, de acordo com a distribuição de bandas ao longo dos cromossomos, o que torna o seu número característico.

As não-disjunções que ocorrem na primeira divisão meiótica são, talvez, as alterações genéticas mais freqüentes da espécie humana, sendo as perdas no primeiro trimestre de gestações (cerca de 50% a 70%) causadas por aberrações cromossômicas. Mesmo entre todas as concepções a freqüência de alterações citogenéticas é alta e com estimativas que variam de 20,6% nos primeiros 15 dias (Plachot *et al.*, 1987) a 10,5% entre as detectáveis após o atraso menstrual (Beiguelman, 1982a). Isso não é de se estranhar, uma vez que alterações citogenéticas ovulares ocorrem em 32% desses gametas (Plachot *et al.*, 1987) e em 8% dos espermatozoides (Martin *et al.*, 1983).

Se admitirmos que as não-disjunções afetam com igual freqüência todos os pares cromossômicos e tomarmos a monossomia do X como exemplo, pode-se estimar que a freqüência de aberrações cromossômicas é responsável pela eliminação de cerca de 60% de todas as concepções, reconhecidas ou não clinicamente. Aqui é

interessante relembrar os dados de Hertig, que estima que *cerca de 15% dos óocitos não são fertilizados, 10 a 15% são segmentados, mas não implantam, 70 a 75% implantam (pelo menos 58%), mas apenas 42% têm viabilidade suficiente para serem percebidas pela paciente através do atraso menstrual* (Schlesselman, 1979). A dados muito similares chegaram Edmonds *et al.*, (1982) com dosagens precisas de B HCG capaz de estabelecer o diagnóstico de gravidez em período tão precoce quanto 8 a 9 dias.

Um casal em que um dos cônjuges possui essa translocação poderá gerar crianças cromossomicamente normais, crianças com a mesma translocação 14/21 herdada de um dos cônjuges e crianças que, além da translocação, têm dois cromossomos 21 livres. Essa última situação determinará um quadro completo de síndrome de Down, indistinguível daquele em que existe trissomia livre do 21. Nesses casos é importante averiguar os parentes consanguíneos colaterais dos portadores da translocação equilibrada, uma vez que poderá haver recorrência dessa síndrome em outros membros da família. Por esse motivo, sempre que um casal referir a presença de síndrome de Down na família é importante saber se esse afetado realizou o exame de cariótipo e qual foi o resultado. Se tal resultado mostrar trissomia livre os familiares poderão ficar tranquilos, pois terão risco similar ao da população da sua faixa etária de gerar crianças com essa cromossomopatia. Se desconhecermos o seu cariótipo, dever-se-á indicar o exame cromossômico do afetado, ou dos seus genitores ou, em último caso, do cônjuge que procura o obstetra e que é parente consanguíneo do afetado, a fim de afastar a hipótese de existência de uma eventual translocação.

Apesar de menos freqüentes, existem situações em que a criança com síndrome de Down apresenta trissomia livre do 21 e um dos genitores possui uma linhagem celular com a mesma trissomia, isto é, ao lado de uma maioria de células com cariótipo normal esse genitor ou genitora possui células com a trissomia igual a de seu filho. O encontro de duas linhagens cromossômicas é chamado mosaicismo e pode ser responsável pela recorrência de síndromes em outros filhos desse casal, mas não em seus familiares. Como o tecido estudado geralmente é o sangue periférico, nunca se pode afirmar a um casal jovem com uma criança com síndrome de Down que ele está isento de risco de gerar outra, uma vez que, ao nível de gônadas, poderá existir uma linhagem trissômica. Por esse moti-

vo é que, nesses casos, se recomenda o diagnóstico pré-natal de futuras gestações.

### Aconselhamento genético

O aconselhamento genético pode ser definido como um processo de comunicação sobre o risco de ocorrência ou recorrência familiar de anomalias genéticas, com as finalidades de fornecer a indivíduos ou famílias: (a) ampla compreensão de todas as implicações relacionadas às doenças genéticas em discussão; (b) as opções que a medicina atual oferece para a terapêutica ou para a diminuição dos riscos de ocorrência ou recorrência da doença genética em questão, isto é, para a sua profilaxia; e (c) eventual apoio psicoterapêutico.

Nessa definição é fácil vislumbrar que uma das metas prioritárias do aconselhamento genético é ajudar famílias que estão ou que supõe estar sob risco de ocorrência ou recorrência de defeitos genéticos, a tomar decisões racionais quanto à procriação. O aconselhamento genético é feito de modo não-diretivo com a finalidade de defender o bem-estar de indivíduos ou de famílias, ajudando-os a resolver problemas de natureza genética, tentando esclarecer-lhe dúvidas e diminuindo ou evitando sofrimentos e preocupações. Ao contrário dos princípios eugênicos, os do aconselhamento genético visam, pois, primordialmente, à defesa dos interesses dos indivíduos e famílias, e não os da sociedade (Beiguelman, 1982).

A biologia molecular vem trazendo um enorme benefício para o aconselhamento genético pela precisão diagnóstica que ela propicia. Com o mapeamento do genoma humano e o conhecimento de suas interações e as mutações mais freqüentes, será possível diagnosticar qualquer uma das 6.000 doenças citadas por McKusick (1992). Por esse motivo, nenhum casal sob risco de gerar uma criança com alguma anomalia genética deverá ser aconselhado, no momento, a métodos contraceptivos irreversíveis. Se esse casal já tiver alguém afetado na família, será importante que se tenha algum material desse caso-índice, para que se possa determinar a mutação e tornar viável e mais fácil o diagnóstico pré-natal ou pré-implantação.

Quando estamos diante de uma gestação, cujo produto conceptual faleceu no período perinatal, seja por prematuridade ou não, com ou sem malformações, é extremamente importante o estabelecimento do diagnóstico da doença causadora do óbito, para que se estabeleça um

correto aconselhamento genético. Raras são as situações em que o feto chega a viver algumas horas e que pode ser atendido por um berçarista com boa experiência em sindromologia. Mesmo os casos com diagnóstico de certeza, deverão ter uma amostra de seu material colhido e conservado para diagnóstico molecular. Por esse motivo, enumeramos, a seguir, algumas condutas que são de grande ajuda para um diagnóstico posterior.

- Obtenção de sangue fetal com seringa heparinizada. Esse sangue pode ser obtido por punção do seio venoso ou cardíaco, logo após ou decorridas algumas horas do óbito fetal, e deve ser enviado na própria seringa que serviu para a coleta para evitar contaminação. Tal sangue deve chegar ao laboratório de citogenética em até 48 horas. Manter refrigerado, mas não congelar.
- No caso de diagnóstico molecular (DNA) o material deve ser coletado com EDTA (tubo de vacutainer de tampa roxa). Esse material se conserva vários dias à temperatura ambiente, ou vários anos se congelado. O mesmo é verdadeiro para biópsia de tecido ou órgão. Não deve ser colocado em formol para evitar a degradação do DNA ou heparina que interfere com a reação em cadeia da polimerase (PCR).
- Biópsia de rim ou pulmão ( $\pm 1\text{cm}^3$  em frasco estéril sem nenhum conservante) ou de fascia lata da musculatura abdominal ou da coxa. Manter refrigerado, mas não congelar se for para cultura de células ou citogenética.
- Amostra de plasma ou soro. Centrifugar em tubo descartável, e transferir o soro para um frasco limpo, de preferência estéril. O soro pode e deve ser congelado para conservação.
- Fotos de corpo inteiro de frente, costas e perfil, além de foto detalhada do rosto.
- Rx do esqueleto.
- Necrópsia macroscópica e microscópica de órgãos internos, com descrição pormenorizada.

Se no hospital onde ocorreu a morte perinatal houver o concurso de um geneticista ou de um berçarista especializado em sindromologia, ele deve ser consultado. Se não for possível a pesquisa de todos os itens acima discriminados, deve-se tentar obter a maior parte deles para que num futuro próximo os genitores possam ter o aconselhamento genético mais apropriado.

### Grupos raciais

Certos grupos humanos pertencentes a segmentos raciais geográficos ou religiosos isolados têm uma frequência maior de determinados genes. Assim o gene da anemia falciforme é muito co-

mun entre os negróides entre os quais, no Brasil, a frequência de heterozigotos é da ordem de 8% (Ramalho, 1986). A probabilidade de dois indivíduos negróides, não-aparentados, possuírem esse gene será, pois, igual a  $0,08 \times 0,08 = 0,0064$  ou 6,4 por mil, ou seja, um entre cada 150 casais de negróides terá um risco de 25% de gerar uma criança com homozigose desse gene. Embora, no Brasil, tal situação tenda a diminuir pela crescente miscigenação, alguns grupos raciais ainda mantêm uma tradição de casamento somente entre seus pares. O quadro 1 chama a atenção sobre alguns desses grupos relacionando-os com as alterações gênicas mais frequentemente observadas e cujo diagnóstico de heterozigose pode ser, na maior parte das vezes, realizadas.

### Casais com problemas de fertilidade

É interessante assinalar que o aumento da taxa de abortos está positivamente correlacionado à idade materna, sendo tanto maior quanto mais precoce for a idade gestacional. Os dados de Gustavii (1984) permitem estabelecer, a partir de abortos clinicamente detectados, o que se observa na figura 1. Tal gráfico mostra, por coeficiente de correlação semelhante a 1, que no momento da fecundação a porcentagem de abortos espontâneos pode atingir até 70% em mulheres com mais de 40 anos. Esse dado é de suma importância para explicar o porquê do relativo insucesso de gestantes idosas, bem como os poucos resultados de fertilização assistida em mulheres de faixa etária beirando a menopausa, além, é claro, da baixa resposta hormonal à indução da ovulação.

Esse aumento da taxa de abortos com a idade está, também, positivamente correlacionado ao aumento das trissomias, cuja frequência pode aumentar cerca de vinte vezes após os 40 anos (Hassold & Chiu, 1985).

Nos casais com abortos recorrentes com translocações deve-se tomar a cautela de analisar se tal translocação permite o nascimento do feto com translocação não-equilibrada. Se permitir deve-se indicar o diagnóstico pré-natal o mais precocemente possível, por células de vilosidades coriônicas ou por amniócitos obtidos por punção precoce de líquido amniótico. Nos casais com aberrações cromossômicas que, provavelmente, não permitem continuidade natural da gravidez e naqueles com cariótipo normal, deve-se sugerir a punção amniótica porque, se passar o período crítico que o casal abortou anteriormente, o feto deverá ter normalida-

**Quadro 1**

Alguns grupos étnicos e alterações gênicas mais freqüentes encontradas nos mesmos.

Grupo étnico	Alteração gênica
Africanos (negróides)	Hemoglobinas S, C, persistência de hemoglobina fetal, talassemia, deficiência de G-6 PD
Caucasóides em geral	Fibrose cística do pâncreas
Chineses	Alfa-talassemia, deficiência de G-6 PD
Esquimós	Síndrome adreno-genital
Ingleses, irlandeses, egípcios italianos e gregos	Defeitos de fusão do tubo neural
Japoneses	Beta-talassemia, deficiência de G-6 PD, febre familiar do mediterrâneo
Judeus ashkenazi	Acatalasia
Sul-africanos (brancos)	Doença de Tay-Sachs, doença de Niemann-Pick
	Porfíria variegada

de funcional dos cromossomos. Nos casais com cariótipo normal deve-se evitar os exames precoces para evitar que o método de punção seja um fator co-determinante do aborto.

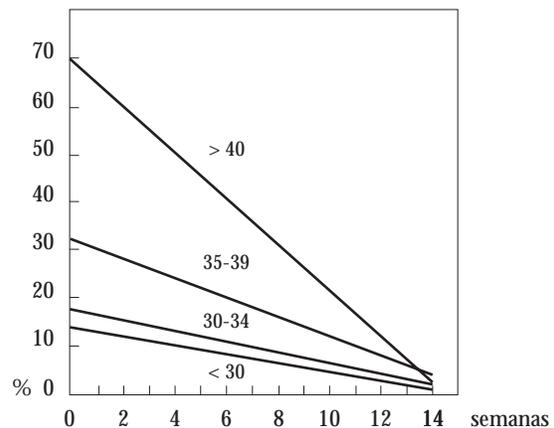
### Diagnóstico pré-natal de doenças genéticas

O diagnóstico pré-natal de doenças genéticas é ainda um procedimento relativamente caro e cresceu rapidamente devido à interação estreita do uso da ultra-sonografia e dos métodos laboratoriais básicos da genética. Ambos propiciaram a invasão do ninho fetal, por meio da qual tornou-se possível obter material do produto gestacional e, assim, proceder a diagnósticos cada vez mais precisos. Com o aprimoramento dessas técnicas, a medicina pôde desenvolver métodos de tratamento intra-útero e de correções fetais, conduzindo a esse novo e promissor campo, que foi denominado medicina fetal.

A tabela 1 dá uma idéia das indicações mais freqüentes em nosso serviço na década de 1990 para o diagnóstico pré-natal utilizando a punção de vilosidades coriônicas, a amniocentese precoce e a amniocentese tradicional. Note-se que a indicação por idade é a mais freqüente de todas. Na última década, graças às facilidades de diagnóstico aumentaram bastante as indicações pela ultra-sonografia e para alterações gênicas freqüentes, como siclemia, talassemia, fibrose cística, síndrome adreno-genital, distrofia muscular de Duchenne, entre outras. É mister assinalar a grande contribuição da biologia molecular, não só facilitando o diagnóstico dessas e outras doenças gênicas, como também o diagnóstico por DNA das doenças infectocontagio-

**Figura 1**

Correlação entre a idade materna e perda fetal em diferentes semanas da gestação de acordo com os dados extraídos de Gustavii (1984).



sas.

As técnicas utilizadas para o diagnóstico pré-natal podem ser reunidas em oito grandes grupos:

- Diagnóstico ultra-sonográfico.
- Estudos através do sangue materno.
- Rastreamento bioquímico e biofísico (Translucência Nucal)
- Punção de vilosidades coriônicas.
- Punção amniótica.
- Cordocentese.
- Fetoscopia.
- Diagnóstico pré-implantação

**Tabela 1**

Indicações de diagnóstico pré-natal de 5.824 gestações.

Indicação	V. C.	Semanas < 14	Semanas > 15
Idade materna ou paterna avançada	952 (4,2)	497 (2,2)	1.968 (2,6)
Filho ant. com cromoss.	50	12	84 (1,2)
Alterações cromos. familiar	5	2	10 (20)
Herança ligada ao sexo	8 (12,5)	1	8 (25)
Erro inato do metabolismo	16 (25)	–	11 (18)
Apreensão dos genitores	450 (1,6)	333 (1,5)	1.328 (1,4)
Def. fusão do tubo neural	5	4	38
Malf. detectada por u.s.	4	4 (50)	34 (17)
Total	1490	853	3481

### Diagnóstico ultra-sonográfico

O avanço técnico dos aparelhos de ultra-sonografia fornece hoje uma resolução extremamente refinada para o diagnóstico de anomalias fetais. Essa resolução permite que as medidas anatômicas fetais sejam determinadas a cada semana de gestação e, conseqüentemente, que se estime a idade fetal e se pesquise a presença de todas as estruturas anatômicas (Elejalde e Elejalde, 1986). Qualquer desarmonia de crescimento de órgãos, regiões fetais ou mesmo atraso no seu desenvolvimento são facilmente visualizados. As malformações fetais passaram a ter os seus sinais específicos e, em menos de uma década, a ultra-sonografia fetal ficou tão minuciosa que passou a demandar do médico que a executa uma sistemática extremamente rigorosa (Pavani *et al.*, 1981), (Hata & Deter, 1992). Vários aspectos fisiológicos são hoje parte dessa rotina, como a presença de líquido no estômago e na bexiga, que atestam a higidez do trato gastroesofágico e o funcionamento renal, respectivamente. A quantidade de líquido amniótico também faz parte dessa avaliação, por estar aumentado em lesões do trato gastroesofágico e diminuído no mau funcionamento do aparelho gênito-urinário.

A visualização fetal considerada outrora, por alguns, como um luxo obstétrico é hoje parte da rotina com que o médico conta para assegurar à sua paciente o bem-estar fetal. Para que essa segurança seja transmitida, é necessário que tal exame seja feito em vários períodos da gravidez, de modo a permitir diferentes diagnósticos de acordo com a época do aparecimento de seus primeiros sinais. Por exemplo, os defeitos de fusão do tubo neural poderão ser detectados a partir da décima primeira semana de gestação, se for utilizado um transdutor vaginal; o funcio-

namento da bexiga entre dezoito e vinte semanas; o perfil dos lábios, que possibilitam o diagnóstico de fendas labiais, a partir da vigésima semana; a defasagem do crescimento do fêmur nos diferentes nanismos, através de exames seqüenciais, a partir de doze semanas; a hidrocefalia, a partir de quatorze semanas, e a microcefalia, por diferentes avaliações, dependendo da época e da etiologia para ela se manifestar (-Kurtz *et al.*, 1980).

Não se pode admitir nos dias de hoje que somente após o nascimento se diagnostiquem malformações que poderiam ser detectadas durante a gestação pelo ultra-som, como, por exemplo, a ausência de dedos, de mãos ou até de membros. Exames ultra-sonográficos bem feitos são capazes de diagnosticar grande parte das malformações e, por esse motivo, não é de estranhar que os programas de monitorização de malformações congênitas devam assinalar nos próximos anos decréscimo acentuado de nascimento de fetos com malformações múltiplas. Isto porque é a ultra-sonografia que mais diagnostica malformações congênitas. Crianças com anomalias graves como a anencefalia, grandes mielomeningoceles e alterações sérias da anatomia fetal não chegarão, pois, a nascer porque gestações com essas alterações serão interrompidas eticamente em fases precoces.

A ultra-sonografia obstétrica é, indiscutivelmente, aquela que mais diagnostica, em freqüência e em número, tanto doenças genéticas quanto não-genéticas e, por esse motivo, aliado ao seu baixo custo e à sua característica não invasiva, deve ser incentivada e priorizada no diagnóstico pré-natal. Se bem feita e rotineiramente indicada ela é capaz de detectar alterações em um de cada vinte ou vinte e cinco fetos, durante a gravidez. Do ponto de vista genético-clínico, em que vários casais são encaminhados

por terem um filho anterior, nativo ou natimorto possuidor de uma ou várias malformações indicadoras ou não de uma síndrome específica, o uso de minuciosos exames de ultra-sonografia pode representar o único meio para assegurar que o filho seguinte não seja malformado.

Uma outra grande aplicação da ultra-sonografia diz respeito à investigação do efeito de agentes teratogênicos, como certos agentes químicos, que são causadores de redução de membros, ou físicos, como a radiação, que pode causar microcefalia, ou, ainda, biológicos, capazes de acarretar retardamento do crescimento intra-uterino, além de microcefalia. Muitas pacientes se esquecem da época exata da última menstruação, mas têm documentado a época da radiação ou da ingestão de certo medicamento. A ultra-sonografia ajuda a decifrar essa data e se o agente for clastogênico (como a radiação e determinadas drogas), e tiver atuado no período peri-concepcional estará também indicado o estudo cromossômico fetal.

Deve-se assinalar, ainda, que a detecção de qualquer alteração ultra-sonográfica do ninho fetal, em qualquer época da gestação, merece a indicação do cariótipo fetal, tendo em vista que de 15 a 30% desses casos mostram alguma alteração cromossômica (Palmer *et al.*, 1987). A tabela 2 é referente a 52 pacientes submetidas a amniocentese por apresentar alguma alteração ultra-sonográfica. A indicação do método inva-

sivo a ser utilizado (biópsia de vilosidades coriônicas, amniocentese ou cordocentese) dependerá da fase da gestação em que foi detectada a alteração.

Alguns sinais anatômicos ultra-sonográficos são suficientes, inclusive, para diagnosticar síndromes. Exemplos bastante significativos se referem à síndrome de Turner. Assim, a presença do higroma cístico em feto do sexo feminino torna altamente possível esse diagnóstico. Sinais importantes como lábio-leporino associado à diminuição das órbitas e presença de polidactilia impõe que se avenge a hipótese da síndrome de Patau. A falta de visualização do osso nasal na 12ª semana de gestação ou um espessamento da pele na nuca de fetos, associada ou não a alterações da relação entre diâmetro biparietal e tamanho do fêmur a partir da 15ª semana constitui associação sugestiva de que o feto pode ser possuidor da síndrome de Down (Benacerraf *et al.*, 1985; Donnfeld & Menutti, 1988). Deve-se chamar a atenção para o fato de que as síndromes que cursam com aumento do líquido amniótico são mais fáceis de diagnosticar, quando comparadas àquelas em que o líquido amniótico está diminuído, porque as imagens pela ultra-sonografia são muito mais nítidas na primeira e de difícil visualização na segunda.

O quadro 2 abaixo modificado de Weaver (1988) é apenas um exemplo de alterações que podem fazer um ultra-sonografista suspeitar de uma síndrome genética. A introdução do ultra-

**Tabela 2**

Aberrações cromossômicas observadas em 52 gestações cujo diagnóstico pré-natal foi indicado em decorrência de alterações fetais detectadas por ultra-sonografia.

Alterações pelo ultra-som	Normais Nº	Anormalidade citogenética	
Poli-hidramnia por gemelaridade ou por diabete	11	0	-
Outras poli-hidramnias	8	1	Síndrome de Patau
Óligo-hidramnia	1	1	Isocromossomo 17q
Atresia de Píloro	0	1	Síndrome de Down
Hidropsia fetal	2	0	-
Malformação do tubo neural	7	0	-
Malformações múltiplas	2	0	-
Microcefalia	2	0	-
Ventrículos dilatados	2	2	Síndrome de Down
Onfalocele	2	1	Síndrome de Edwards
Tumoração cervical	1	2	Síndrome de Turner
Retardo do crescimento intra-uterino	3	1	Triploidia
Dois vasos umbilicais	2	0	-
Total	43	9	
	(82,7%)	(17,3%)	
Semanas de gestação			
x = 28,2 SD= 6,6			

som tridimensional e o aperfeiçoamento na visualização da anatomia fetal e suas alterações fará com que os ultra-sonografistas se voltem cada vez mais para a sindromologia ou que trabalhem estreitamente com grupos de medicina fetal, desenvolvendo refinamentos da avaliação ultra-sonográfica de sinais importantes para o diagnóstico de síndromes específicas.

Finalmente, não podemos deixar de mencionar, novamente, as aplicações do ultra-som na detecção de alterações anatômicas em fetos oriundos de casamentos consanguíneos, uma vez que tais casais deverão ser considerados como de risco de gerar filhos com alterações anatômicas.

### Estudo do sangue materno

Antes de abordarmos a metodologia invasiva de diagnóstico pré-natal de alterações fetais, teceremos algumas considerações a respeito do diagnóstico pré-natal com o uso do sangue materno. As vantagens que advirão do desenvolvimento de técnicas que sirvam para o diagnóstico de alterações fetais a partir do estudo do sangue materno são indiscutíveis, pois propiciarão a triagem em massa de muitas doenças genéticas.

Sabe-se que células fetais atravessam a placenta e podem ser encontradas na circulação materna (Schröder & De La Chapelle, 1972) e que tais células poderão ser concentradas ou se-

paradas por métodos imunológicos, com o uso, por exemplo, de anti-I fetal (Kan *et al.*, 1974). A aplicação dos cicladores de temperatura para a multiplicação de genes com o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) é capaz de multiplicar genes ou regiões específicas de genes milhões de vezes no intervalo de algumas horas. Com isso, é de se esperar que em futuro bem próximo será possível o diagnóstico bioquímico de alterações de várias doenças genéticas e mesmo de doenças infecto-contagiosas com o uso de células fetais obtidas por simples punção venosa da gestante (Simpson & Elias, 1993).

Creemos, também, que o maior obstáculo para a obtenção de células fetais será a incompatibilidade materno-fetal no sistema ABO, uma vez que os antígenos desse sistema são encontrados não apenas nas hemácias, mas também nas células de outros tecidos incluindo os leucócitos. Mesmo assim, será considerável o número de fetos compatíveis com sua mãe no sistema ABO e que permitirão a existência de células fetais na circulação sanguínea materna. Diga-se de passagem, que os grupos sanguíneos constituem o primeiro exemplo, no qual a dosagem de anticorpos séricos no sangue materno permitiu o diagnóstico da constituição genética do grupo sanguíneo fetal, tanto no sistema ABO, quanto no sistema Rh ou Kell. Ao lado disso, vários marcadores protéicos e enzimáticos podem ser constatados no soro materno em micro-quantidades, mas suficientes para serem detectados por métodos bioquímicos.

A dosagem de alfa-fetoproteína no soro materno (AFPSM) para a detecção dos defeitos de fusão do tubo neural constitui o melhor exemplo dessa situação (Band *et al.*, 1977). O fechamento do tubo neural ocorre nas primeiras semanas de gestação, mais precisamente até a terceira e quarta semanas. Fatores do meio ambiente associados a uma predisposição genética são capazes de alterar o seu desenvolvimento podendo originar uma série de malformações denominadas, genericamente, como defeitos de fusão do tubo neural. De acordo com a época, a intensidade e as características de tais fatores, essas malformações poderão ser traduzidas em anomalias compatíveis com a vida como as meningos e mielomeningoceles, ou mais graves como as encefalocelos e até anomalias invariavelmente letais, como a anencefalia. Aquelas compatíveis com a vida poderão condicionar debilidade e incapacidade física e/ou mental para a criança e um grande dispêndio emocional, social e econômico para a família.

### Quadro 2

Sinais ultra-sonográficos importantes sugestivos de alterações genéticas e/ou síndrome fetais (Weaver, 1988).

Ascite	Lábio leporino
Atresias	Microcefalia
Bexiga-distensão	Microftalmia
Bradycardia sinusal	Mielomeningocele
Cistos	Morte fetal
Contraturas congênitas	Oligo-hidramnia
Cordão umbilical, anormalidades	Onfalocele
Encefalocelos	Palato fendido
Fêmur curto	Pericárdio, efusão
Fraturas	Placenta, anomalias
Gemelaridade, desordens da	Pleura, efusões
Genitálias, defeitos cloacais	Polidactilia
Hematomas	Pterigium
Hidramnia	Radio, aplasia
Hidrocefalia	Retardo de crescimento intra-uterino
Hidronefrose	Rins, ectopia
Hidropsia fetal	Rins multicísticos
Hidrotórax	Taquicardia supraventricular
Hidroureter	Trombocitopenia
Hipertelorismo ocular	Tumores
Hipotelorismo ocular	Ureteres, obstrução

Em nosso meio o conjunto de defeitos de fusão do tubo neural apresenta-se numa frequência de 1 em cada 700 nascidos vivos (Brunoni, 1986), sendo importante assinalar que os casais que já tiveram uma criança com defeito de fusão do tubo neural têm um risco de recorrência de 3 a 5% em uma nova gravidez. Caso tenham duas crianças afetadas, o risco de uma nova ocorrência atinge 15%. Apesar de o ácido fólico ministrado a partir da concepção reduzir em três quartos o risco de recorrência dessa alteração (Wald *et al.*, 1991), tais casais devem ser submetidos a dosagem da AFPSM para o diagnóstico de eventual recorrência. O mesmo é verdadeiro para casais de isolados genéticos ou de populações com alto índice dessa doença, como ocorre na Irlanda do Norte (1%), na Alexandria (0,55%) e em Bombay (0,55%) (Crandall, 1978).

Como a AFPSM aumenta progressivamente no sangue materno a partir da sétima semana de gestação, os valores obtidos devem ser relacionados ao tempo de gestação. A época ideal para a realização da dosagem de AFPSM situa-se entre a 16ª e 18ª semanas de gestação e antes de realizá-la não pode ter havido manipulação uterina por punção ou qualquer procedimento invasivo. Se a dosagem da AFPSM for alta, esse casal deve ter a indicação da realização de ultrasonografia fetal dirigida à coluna vertebral fetal (vértebra por vértebra) e, mesmo que normal ou duvidosa (dependendo da precisão do aparelho empregado), se submeter à dosagem de alfa-fetoproteína no líquido amniótico (AFPLA).

Várias situações podem causar um aumento do valor da AFPSM, tais como sub-estimativa da idade gestacional, gestação múltipla, onfalocele, pré-eclampsia, infecções maternas etc., mas não devem excluir a pesquisa de alterações de fusão do tubo neural ou a dosagem da AFPLA (Burton, 1988). Outra associação interessante diz respeito a baixos valores de AFPSM assinalados na síndrome de Down (Knight *et al.*, 1988).

### Testes de rastreamento

A despeito de ser sobejamente conhecida a relação de idade com aberrações cromossômicas, a realização de métodos invasivos em gestantes com mais de trinta e cinco anos foi capaz de detectar apenas de 20 a 30% das crianças que nascem com síndrome de Down. Isto porque o percentual relativo de síndrome de Down em mulheres jovens multiplicado pelo número de mulheres sob risco suplanta aquele obtido em

mulheres com mais de trinta e cinco anos.

A dosagem de Alfa-fetoproteína em gestantes com fetos portadores de síndrome de Down permitiu ver que havia uma associação dos baixos valores dessa substância nessas gestantes, permitindo que se fizesse uma triagem das gestantes de maior risco (Cuckle *et al.*, 1987). Em seguida, com um grande banco de soros de pacientes que estavam gerando crianças normais e crianças com síndrome de Down, pôde-se associar também os valores altos de B<sub>hcg</sub> com a geração de síndrome de Down (Chard *et al.*, 1984). A partir dessas observações e da pesquisa de outras substâncias produzidas pelo feto ou decorrentes deste, incorporou-se também o Estriol livre como outra substância associada e que constitui o chamado triteste (Wald *et al.*, 1988, 1992).

O triteste (realizado entre quinze e vinte semanas) detecta cerca de 65% das gestações com síndrome de Down. Segundo experiência internacional, serão considerados “fetos de risco para síndrome de Down”, ou seja, rastreamento “positivo”, aqueles que na análise do soro materno mostrarem valores de AFPSM menores que 0,5 MoM (múltiplos da mediana), de estriol livre menores que 2,5 MoM e de gonadotrofina coriônica maiores que 2,0 MoM. Além disso, este teste ajuda a rastrear 98% das gestantes com defeitos abertos do tubo neural e 60% dos defeitos abertos da parede abdominal.

O triteste é capaz também de rastrear outras aberrações cromossômicas, como trissomia do cromossomo 18 (aproximadamente 80%), trissomia do cromossomo 13 (cerca de 30%) e monossomia do cromossomo X (45,X) em 44%.

Um triteste “positivo” não significa que foi diagnosticada uma aberração cromossômica. O médico ou o geneticista clínico deverá discutir com o paciente os testes adicionais para determinar se a criança tem realmente uma doença e as outras explicações referentes ao teste positivo. A gestante pode ter uma idade gestacional maior do que pensava, pode estar gerando gêmeos ou, mais freqüentemente, os níveis dessas proteínas séricas são simples variações da normalidade. Os testes adicionais incluem um ultra-som morfológico, e um teste cromossômico (biópsia de vilo corial ou amniocentese), que pode diagnosticar com acuracidade e segurança se a criança é cromossomicamente normal.

A procura de um teste mais precoce levou os pesquisadores a desenvolverem um teste aplicado no primeiro trimestre e as substâncias mais específicas relacionadas a ele foram o PAPP-A

(Pregnancy Associated Plasma Protein-A) e o  $\beta$ hcg livre. As mulheres gestando uma criança com síndrome de Down apresentam níveis mais baixos de PAPP-A e mais elevados de  $\beta$ hcg livre (Wald *et al.*, 1996). Para que esse teste atingisse uma triagem de cerca de 68% das gestações com síndrome de Down, o teste foi considerado positivo quando o risco fosse igual ou superior a 1/400. Se os valores desses dois testes forem associados à medida ultra-sonográfica da região nucal conhecida como translucência nucal, os valores combinados podem aumentar o poder de triagem para 80 a 95% (Wald e Hackshaw, 1997).

Ainda assim sobraria um percentual de aberrações cromossômicas não detectado pela triagem e que inclui a própria síndrome de Down. Somente um procedimento invasivo, geralmente a amniocentese, pode diagnosticar todas as aberrações cromossômicas.

Apesar de esses testes de triagem serem bastante promissores, deve-se tomar cuidado na interpretação de seus valores, uma vez que essas dosagens devem ser corrigidas com relação ao tempo de gravidez, à idade da gestante, ao grupo racial, ao peso da paciente, a doenças crônicas como a diabetes materna, à gestação gemelar etc. Deve-se ainda chamar a atenção para a confusão que muitas pessoas fazem ao realizar esses testes, pois pensam que eles são uma alternativa de substituição da amniocentese para pesquisa de alterações cromossômicas associadas com a idade dos genitores ou com a história familiar de aberração cromossômica.

### Translucência nucal

Nicolaides e colaboradores em 1992 chamaram a atenção para a medida da translucência nucal (TN) em fetos de gestações entre 10-14 semanas, que poderia ser usada como triagem de aberrações cromossômicas. A partir desse trabalho seguiram vários outros na própria Inglaterra, Itália, Espanha, Brasil etc (Brambati *et al.*, 1995; Comas *et al.*, 1995; Ximenes *et al.*, 1997). Desses trabalhos ficou claro que quanto maior a medida da TN, maior seria a probabilidade de a paciente estar gerando uma criança com uma cromossomopatia. Como as cromossomopatias também aumentam com a idade materna, frequências de medidas maiores de TN são encontradas em mulheres com mais de 35 anos. Com o feto em posição sagital (como na medida cabeça-nádegas), a medida da TN é feita medindo-se a máxima espessura da translucência entre a pele e o tecido mole que cobre a espinha cervical. A medida de 2,5mm diferencia as mu-

lheres de risco maior daquelas com menor risco de estarem gerando uma criança com cromossomopatia. Medidas entre 2,5 e 3,9mm aumentam o risco em 3 vezes; medidas entre 4,0 e 4,9mm aumentam 18 vezes; entre 5,0 e 5,9mm aumentam 28 vezes; e igual ou maior que 6,0mm aumenta 36 vezes o risco esperado de acordo com a idade materna. É claro também que quanto maior a translucência maior a probabilidade de aborto espontâneo; medidas acima de 5,0mm estão relacionadas a uma taxa de 13% de aborto (Pandya *et al.*, 1995). Neste tipo de rastreamento também é mister chamar a atenção que cerca de 3-4% das gestantes em geral podem ser triadas como estando sob risco aumentado, mas não significará que o feto é seguramente anormal. O mesmo se diga em relação às gestantes com medidas inferiores a 2,5mm que, embora com menor risco após a triagem, não estão isentas de estar gerando uma criança com cromossomopatia. Assim, pacientes com mais de 35 anos poderão mostrar a TN normal e assim terão um maior sossego para realizar a amniocentese após duas a quatro semanas. Cabe ainda lembrar que a TN não é específica de cromossomopatia, podendo ser encontrada em cardiopatias e em diversas síndromes como a de Noonan, Hígroma Cístico etc. O uso da TN é capaz de detectar cerca de 50% das cardiopatias congênitas, sendo, assim, usado como rotina para tranquilizar casais que já tiveram uma criança com essa afecção.

### Punção de vilosidades coriônicas

Apesar de a amniocentese ter sido a técnica mais amplamente utilizada para o diagnóstico pré-natal de anomalias genéticas, tanto ela quanto a biópsia fetal transvaginal começaram a ser desenvolvidas na mesma década de 1960. Mohr (1968) iniciou essas biópsias em 63 pacientes utilizando um endoscópio. Nessa primeira amostra, obteve 32 biópsias contendo vilosidades coriônicas, mas não conseguiu os cariótipos pelo insucesso das culturas. Já nessa época, relatavam poucas complicações maternas (Hahne-mann & Mohr, 1968, 1969). Num trabalho cooperativo feito por esse grupo em 1974, os autores referem que, após a 12ª semana, obtinham além do córion, o âmnion e havia muita perfuração de bolsa amniótica. Em 1975, um grupo do Hospital Tietung da China relatou o primeiro estudo de determinação do sexo em uma amostra de 100 pacientes. Tanto esse estudo quanto os posteriores tiveram uma grande margem de erro no diagnóstico de sexo, o que desestimulou a aplicação da punção de vilosidades

coriônicas em larga escala, a despeito da precocidade de sua realização e, conseqüentemente, das menores implicações psicológicas de seus resultados para as mães.

Posteriormente, Simoni *et al.* (1983) descreveram as primeiras amostras em que o índice de sucesso era relativamente alto, o que estimulou numerosos centros a utilizar a punção de vilosidades coriônicas no diagnóstico pré-natal de anomalias genéticas.

À essa época, a amniocentese era realizada entre a 14ª e 16ª semanas, sendo necessárias, ainda, mais duas a três semanas para que se concluísse ou não pela normalidade fetal. Isso porque a maior parte do tempo era despendida no cultivo de células, tanto para a cariotipagem quanto para o diagnóstico enzimático ou mesmo para estudos de biologia molecular. A padronização de uma técnica que podia ser aplicada a partir da sétima semana de gestação veio ao encontro da ansiedade natural de médicos e pacientes, pois um resultado em fase tão precoce tornaria, nos casos alterados, mais fácil e menos agressiva a interrupção da gestação, tanto do ponto de vista técnico, quanto psicológico.

A técnica de biópsia aspirativa transcervical consiste basicamente na inserção intra-uterina de um cateter que tenha em seu interior um mandril que possa lhe dar a direção. O uso da ultra-sonografia para orientação do cateter facilita sobremaneira o índice de sucesso. Esses cateteres medem 21-25cm, com diâmetro variando entre 1 a 2,3mm. Em gestações de até 12 semanas, a bolsa amniótica não preenche ainda a luz do útero. O córion começou a diferenciar o córion frondoso, que irá constituir o local da placenta. É a região de maior índice mitótico e, portanto, a área da qual será coletado o material.

Nunca é demais recomendar um exame bacterioscópico na semana que antecede a punção para evitar possível infecção intra-uterina.

A punção de vilosidades por via transabdominal tem algumas vantagens em relação à transvaginal, quais sejam: a) ela pode ser feita em qualquer época após a décima semana de gestação; b) supõe-se que seja de menor risco quando comparada à transvaginal; c) não necessita de bacterioscopia prévia.

No dia da punção, com a gestante de bexiga cheia, deve-se fazer uma minuciosa pesquisa da região do córion frondoso e da implantação do cordão umbilical. Esta região é, geralmente, onde o córion frondoso é mais espesso. A região do córion a ser puncionada deve apresentar-se como a mais espessa em um corte longitudinal da

placenta.

### Contra-indicações

Existem algumas recomendações prévias para a realização da biópsia aspirativa de vilosidades coriônicas (BVC) por via transvaginal (BVC). Uma delas, de grande importância, é o exame bacteriológico do conteúdo vaginal prévio ao exame, que deve ser realizado cerca de 10 a 14 dias antes, a fim de propiciar seu tratamento caso algum agente adventício seja constatado. A presença de herpes simples também constitui um obstáculo à sua realização. Outro impedimento dessa via é encontrado nas pacientes que foram submetidas à conização pregressa. Essas situações podem ser contornadas pela realização de BVC por via abdominal, cujo risco de infecção é semelhante àquele da amniocentese. Uma outra contra-indicação existe quando a paciente refere sangramentos anteriores ao exame ou quando a paciente já possui pelo menos dois abortamentos cuja etiologia é desconhecida. Isso porque, se desconhecemos a sua origem, poderemos estar "facilitando" a sua recorrência. Antes da ultra-sonografia que monitorizará a punção (qualquer que seja a via), deve-se ter o cuidado de informar a paciente sobre a alta incidência de abortos espontâneos nessa fase, a qual aumenta muito com a idade materna (Figura 1). Além disso, a punção de vilosidades coriônicas e sua análise permitem detectar algumas trissomias que não seriam observadas algumas semanas mais tarde. Com isso, poderemos estar realizando um exame que não seria necessário se aguardássemos algumas semanas, uma vez que tais aberrações não permitiriam a sobrevivência fetal.

A imunização prévia no sistema Rh também é outro fator para a contra-indicação da BVC porque, indubitavelmente, essa biópsia induz à mistura de sangue materno e fetal (Warren *et al.*, 1985). Para casais com filhos anteriores portadores de malformações não devidas a alterações cromossômicas, mas para as quais há suspeita de que possa haver recorrência (por exemplo, malformações de membros, malformações cranianas, malformações múltiplas etc.) ou em relação às quais se tem a certeza da participação de um componente genético (por exemplo, defeitos de fusão do tubo neural, nanismo etc.) não existe razão para indicar a punção de vilosidades coriônicas, porque o risco de recorrência dessas entidades é, em geral, superior àquele das aberrações cromossômicas, a não ser, é claro,

que estejamos fazendo o exame para pesquisa com determinada sonda de DNA. Deve ser explicada à gestante a limitação desse método e que, em certas situações, essas punções poderão alterar exames posteriores, como, por exemplo, a dosagem de alfa-fetoproteína.

Os casos de gemelaridade em que existe um feto vivo ao lado de outro em reabsorção ou “ovo cego”, situação essa que pode ocorrer em cerca de uma de cada cinquenta gestações, devem ser vistos com muita cautela, pois, diante de um resultado anormal, nunca seremos capazes de garantir que o resultado diz respeito ao feto vivo. Um feto sem batimentos cardíaco-fetais pode manter por semanas vilosidades coriônicas vivas e dificilmente teremos a certeza de que não houve uma “contaminação” com células do aborto retido (como já vimos, a taxa de aberrações cromossômicas em abortos é muito alta). No caso de gêmeos, com placentas muito próximas ou unidas, é válido o mesmo raciocínio e não devemos nos esquecer que o risco de duas punções deve, possivelmente, dobrar.

O risco de abortamento inerente à BVC foi estabelecido com o mínimo de viés por um estudo colaborativo do Canadá e sua estimativa é de 0,6 a 1,6% (Milner *et al.*, 1989). Tal risco implica a perda do conceito por infecção, por ruptura de membranas ou por outras causas. Deve-se assinalar que em nossa casuística pessoal a ruptura de membranas ocorreu com uma frequência de cinco em mil, predominando esse acidente nas primeiras centenas coletadas. A maioria delas, porém, prosseguiu sem intercorrências e sem seqüelas para os fetos, devido à ausência de infecção concomitante. Nas primeiras semanas, houve perda de quase todo o líquido, que se reconstituiu nas semanas subseqüentes. Duas delas, em que houve aspiração indesejada de líquido amniótico, permitiram o cultivo, com sucesso, de células amnióticas.

Foi descrito recentemente que a BVC realizada antes da nona semana pode provocar redução de crescimento de membros, em cerca de 0,5% dos casos (Mastroiacovo *et al.*, 1991). Apesar de tal assunto ainda suscitar controvérsias, é recomendável não realizar a biópsia antes da décima semana. Também nunca é demais reforçar a indicação da globulina anti-D nas pacientes Rh negativo que têm a possibilidade de gerar crianças Rh positivo, a fim de assegurar o potencial reprodutivo dessas mulheres.

Quanto aos resultados, do ponto de vista técnico, cremos ser aconselhável esclarecer alguns pontos básicos às pacientes, antes da opção

da BVC, a fim de que seu consentimento seja consciente por ter conhecimento da precisão do método. Não é raro que na fase de mórula possam ocorrer não-disjunções cromossômicas que provoquem o aparecimento de mosaicismos (Kalousek, 1985). Tal mosaicismos é encontrado com certa frequência no nível placentário e pode implicar cromossomos compatíveis com o nascimento do feto, como ocorre com os cromossomos sexuais, o 13, o 18 e o 21. As alterações cromossômicas que não permitem a sobrevivência causam menos preocupação, mas também são indicadores de uma futura punção amniótica a fim de assegurar a normalidade cromossômica fetal. A maioria desses mosaicismos está associada a gestações de crianças normais, mas isso somente pode ser assegurado após a comprovação dos resultados pela punção amniótica e/ou cordocentese.

Outro esclarecimento que também deve ser dado às gestantes para que elas dêem consentimento consciente diz respeito à possibilidade de haver resultados falsos. Esses resultados falsos podem ser divididos em falsamente positivos e falsamente negativos. No caso de resultados falsamente positivos, o laboratório constatará uma trissomia ou outra aberração nas células analisadas, mas que não estão presentes no feto, o qual é normal. Isso ocorre em cerca de um por cento das vezes e, mesmo que o casal permita conferir o resultado em células de tecido fetal, raramente esse casal deseja que lhes seja transmitido o resultado. Quando a indicação da biópsia de vilosidades coriônicas for devida à Translucência Nucal aumentada, esses falsos resultados devem ser desconsiderados porque existe um sinal biofísico de peso associado ao resultado.

A situação mais conflitante é a do falso negativo, em que as células analisadas se apresentam citogeneticamente normais, mas, ao nascimento, constatamos uma aberração cromossômica. Esta situação ocorre em um de cada mil diagnósticos (Hogge *et al.*, 1986 e Simoni *et al.*, 1987). Outras situações intermediárias são facilmente contornáveis, como ocorre, por exemplo, nos falsos positivos, em que a aberração encontrada é incompatível com a sobrevivência fetal até aquela semana gestacional. Uma aberração dessa ordem foi por nós detectada, já tendo sido descrita, em relação à trissomia 16 (Simoni *et al.*, 1985). O casal tinha sido punccionado na 12ª semana de gestação com um feto vivo e ativo e ao laboratório foi constatado tratar-se, indubitavelmente, de trissomia do cromossomo 16.

Como essa trissomia é incompatível com fetos maiores que 1mm, e ocorre mais freqüentemente em “ovos anembrionados”, suspeitamos de mosaïcismo confinado à placenta. A amniocentese confirmou a presença de feto normal com 46 cromossomos.

O cultivo das células das vilosidades coriônicas também deve ser encarado com restrição quando apresentar um resultado diferente daquele que encontramos na preparação direta ou na cultura de curta duração. Isso porque nessas últimas o cariótipo que analisamos é o de células que já se encontram na fase natural e final de divisão celular, devendo corresponder ao cariótipo do tecido *in situ*, ao passo que no cultivo poderemos ter a diferenciação de células de determinada classe celular. Desse modo, a presença de resultados diferentes oriundos de dois métodos aplicados à coleta de um mesmo material por BVC deve, obrigatoriamente, ser inconclusivo e indicativo de punção amniótica.

Ao leitor poderia parecer que, com tantos cuidados técnicos, a biópsia aspirativa de vilosidades coriônicas poderia ou deveria ser colocada em segundo plano. Não é essa nossa opinião. Acreditamos que ela tem as suas vantagens e indicações de excelência comparadas aos outros métodos de obtenção de material fetal. Assim, não se discute sua indicação nos casais de alto risco de gerar crianças com cromossomopatia, como ocorre nos fetos com translucência nucal aumentada, nas translocações, ou nos casais heterozigotos com risco de gestação de crianças com determinado erro inato do metabolismo ou outras doenças genéticas recessivas ou dominantes em que já se tenha um diagnóstico por sondas de DNA. Nessas situações, o risco de recorrência ou do aparecimento da alteração genética ultrapassa, geralmente, os 25%, e o custo/benefício ao lado da enorme diminuição da ansiedade é plenamente justificável. Como, a cada dia, a ultrasonografia e os métodos de biologia molecular se tornam mais simplificados e mais abrangentes, a biópsia aspirativa de vilosidades coriônicas veio para ficar.

### Amniocentese

A amniocentese realizada a partir da 14ª semana é um dos métodos mais difundidos para a obtenção de material fetal com finalidade de diagnóstico pré-natal de alterações genéticas, embora, historicamente, ela tenha surgido na mesma época que se desenvolveram os primeiros trabalhos de coleta de vilosidades coriônicas. Isso se

deveu, provavelmente, à má visualização da área para sua obtenção, em uma época em que a resolução dos aparelhos de ultra-sonografia era muito inferior quando comparada à de nossos dias (Nazareth *et al.*, 1981). Além disso, a segurança e o baixo índice de complicações decorrentes da amniocentese fizeram com que ela se tornasse rotina na maioria dos serviços (Pinto Jr. *et al.*, 1987).

O risco de sérias complicações, incluindo perda fetal, varia nos diferentes centros de 0,2% a 0,5% (Golbus *et al.*, 1979). Essa variação deve ser decorrente do método de monitoragem aplicado à punção. Os bons serviços só executam o procedimento de punção se realizado com toda a assepsia de um teatro operatório, incluindo o uso de material esterilizado e o revestimento da sonda de ultra-som com invólucro estéril uma vez que ela acompanhará a introdução da agulha até o lago amniótico escolhido. Parece desnecessário acentuar que, previamente à punção, o feto deve ser minuciosamente avaliado em sua proporcionalidade através das medidas dos diâmetros bi-parietal, occipitofrontal, torácico e abdominal, bem como o tamanho do fêmur. Deve-se, também, analisar seus movimentos, os membros, a coluna vertebral, o cérebro, coração, rins, estômago e, eventualmente, bexiga, número de vasos e implantação do cordão umbilical, além da hidramnionia.

Esse minucioso exame tem a intenção de detectar qualquer anormalidade fetal prévia à amniocentese, a qual, se presente, deverá ser comunicada ao casal antes do procedimento. Ao lado disso, esse exame prévio poderá determinar o local ou os locais de maior facilidade para punção por possuírem o maior lago amniótico, serem mais distantes do pólo cefálico e, preferencialmente, longe dos núcleos placentários. Se para realizar a punção houver necessidade de transpassar a placenta, isto não implica riscos maiores (Crane & Kopta, 1984). O mais importante é, realmente, essa monitorização de modo a dar a certeza do caminho a ser percorrido pela agulha, o que implica menos probabilidade de obter líquido com sangue ao evitar que a agulha atravesse a cavidade amniótica e puncione vasos ou a placenta localizada posteriormente. A monitorização evita, também, que a agulha seja introduzida mais de uma vez, o que diminui a possibilidade de lesões fetais.

Mesmo tomando todos esses cuidados poderá ocorrer a perda de líquido amniótico, aborto ou, ainda, amnionite. Fica muito difícil explicar a amnionite como decorrente de uma falha

médica quando se tomam todos esses cuidados, a não ser que as luvas não estejam estéreis e a agulha seja tocada por elas previamente à punção. Por esse motivo, a agulha só deve vir à mão do puncionador através de seu canhão quando já se conhecer exatamente o ponto em que ela será introduzida. Após a aspiração de uma a três seringas de líquido amniótico, o mandril não deve ser reintroduzido para retirada da agulha, uma vez que o mesmo ficou exposto ao ar por alguns minutos. Se houver necessidade de se locar a agulha por uma segunda vez, esta deve ser trocada. As seringas devem ser numeradas em ordem crescente a fim de que o laboratório possa diagnosticar mais facilmente o crescimento de células maternas misturadas às fetais. Quando isso ocorre, esse acontecimento é mais provável nos tubos de cultivo oriundos da primeira seringa. Procedendo com todo esse cuidado, acreditamos que, se ocorrer amnionite, ela pode ser decorrente de bactérias oriundas do organismo materno e localizadas entre a pele e a bolsa amniótica.

A perda franca de líquido amniótico, que em nossa casuística ocorreu em cerca de 1 em cada 1.000 punções, e a perda discreta, em 1/200 punções, merecem uma consideração especial. Se a punção foi alta e a perda, visualizada pelo ultrassom, oriunda de um rompimento baixo, é porque deve tratar-se de uma gravidez que já tinha algum comprometimento anterior, geralmente por infecção ascendente e que, devido à introdução da agulha, houve um estímulo que provocou a contração uterina. Essa contração pressiona a bolsa em todos os sentidos e, naquele local onde já está acontecendo uma lesão por infecção, tem-se a ocorrência de perda aguda de líquido nas primeiras horas após a punção, muito freqüentemente acompanhada de amnionite.

Se, entretanto, a punção for alta e a perda se der pelo orifício puncionado, ocorrerá perda crônica, discreta ou em jatos, e com tendência a parar com o repouso da paciente, a qual não apresentará febre. Ela deve ser seguida com controles contínuos de temperatura, pesquisa de odor vaginal e leucograma, podendo ainda sofrer cobertura antibiótica. Essas pacientes com perda de líquido asséptico geralmente prosseguem a gravidez e o fluido amniótico se recupera após duas ou três semanas, coincidente com maior funcionamento renal. Outras complicações menores são as lesões fetais que aparecem ao nascimento como pequenas "cavinhas" na região tocada pela agulha. Se não monitorizadas pelo ultrassom, poderão ocorrer lesões graves,

dependendo da região atingida pela agulha, tendo já sido descrita gangrena de membro e lesão de articulação de joelho (Milunsky, 1979).

Alguns autores referem que a punção amniótica não provoca aumento da taxa de imunização no sistema Rh (Tabor *et al.*, 1986), ao contrário de outros, que mostram freqüência aumentada de mulheres imunizadas quando submetidas à punção amniótica (Golbus *et al.*, 1982). Esses últimos autores assinalam uma taxa de imunização da ordem de 2,1-5,2% maior que a observada nas mulheres não submetidas a esse procedimento. A conduta mais precavida parece ser a ministração de gamaglobulina Rho a toda paciente Rh negativo com potencial de gerar feto Rh positivo.

A punção com sangue é, em grande parte das vezes, decorrente das dificuldades de se atingir o lago amniótico desejado. Ela é mais freqüente quando se introduz por duas vezes a agulha. Quando for um vaso da parede anterior do útero, geralmente é somente a primeira seringa que se contamina com o mesmo. Quando é da parede posterior, resultante da perfuração de vasos dessa região, pode-se notar pelo ultrassom o borbulhar para a cavidade amniótica. A perfeita monitorização da posição da ponta da agulha pode diminuir muito esse acontecimento.

Não é raro, após a introdução da agulha, visualizarmos sua ponta no lago amniótico e não obtermos líquido. Se nos detivermos mais à visualização ultra-sonográfica poderemos notar que a agulha está empurrando a membrana amniótica sem perfurá-la. Com uma simples retração da agulha e nova introdução mais abrupta ou com um movimento de rotação da mesma obter-se-á o líquido desejado sem necessidade de nova locação. A seringa deixada repousada por alguns minutos nos esclarecerá se o sangue foi um resultado da punção ou se já se encontrava no líquido amniótico. Quando ele for devido à punção, o sangue sedimentará rapidamente e o sobrenadante será amarelo límpido. Se o sangramento for antigo, o sobrenadante continuará vermelho. Deve-se sempre adicionar algumas gotas de heparina para evitar sua coagulação na seringa, que só ocorre se o sangue for devido à punção.

Como a probabilidade de crescimento celular diminui nos líquidos com sangue, pode haver necessidade de nova punção, o que deve ser avisado à paciente. Na repetição, o líquido ainda estará sanguinolento mas, seguramente, com menos hemácias para atrapalhar o crescimento

celular. Cerca de 95% das vezes o sangue contaminante é de origem materna e, se devido à punção, não trará conseqüências ao prognóstico da gestação.

O líquido meconial, que ocorreu em cerca de 1,91% de nossa casuística, é associado a sangramentos vaginais anteriores à punção ou à punção anterior de vilosidades coriônicas. Sua cor é, geralmente, marrom claro ou, mais raramente, marrom esverdeado. Seu reconhecimento é muito fácil no nível laboratorial por apresentar um grande sedimento. Quando tal líquido é posto em cultura, as micropartículas do mecônio aderem fortemente ao fundo do tubo e não permitem a adesão de células vivas, que normalmente já são poucas (o líquido amniótico na 16ª semana contém cerca de 12.000 células por ml, sendo em média apenas 6 vivas por ml). Se tal líquido apresentar níveis elevados de alfa-fetoproteína, o prognóstico é menos favorável e deve ser explicado à paciente. Por outro lado, a continuidade da gestação não implica para seu nascituro prognóstico diferente de outras gestações, uma vez que essas crianças não apresentarão seqüelas neuropsicomotoras como foi demonstrado por Pinto em 1993.

Do ponto de vista laboratorial, os erros diagnósticos são bem mais raros quando comparados ao exame das vilosidades coriônicas. As raras falhas descritas se referem à contaminação com células maternas por laboratórios que não tiveram o cuidado de separar as diferentes seringas, nem de analisar tais células empregando polimorfismos de bandas Q e C. Outra técnica que também deve ser aplicada é a análise *in situ* que discrimina se um mosaicismo encontrado originou-se *in vitro* ou se é um mosaicismo que ocorre no feto.

Se o mosaicismo tem potencial de viabilidade como ocorre com células trissômicas do cromossomo 21 (ou dos cromossomos 13, 18 e sexuais), a apreensão pode ser tanto maior quanto maior a sua freqüência. Essa situação pode ser contornada pela indicação do uso da técnica do FISH (fluorescence *in situ* hybridization) ou da cordocentese nos mosaicismos viáveis e de alta freqüência relativa. Uma das situações mais embaraçosas é a presença de translocações aparentemente equilibradas. Se presentes nos pais, geralmente se atribui risco praticamente zero de o feto ser anormal. No caso de cromossomos "marcadores", presentes ou não nos genitores, a situação pode ser bem mais complicada, necessitando do emprego de citogenética molecular e uma detalhada explanação aos genitores para

uma decisão definitiva. Uma ótima revisão pode ser encontrada no artigo de Lillian Hsu (1986).

### **Anniocentese precoce**

A anniocentese precoce, definida como aquela realizada com quatorze semanas ou menos de gestação, passou a ser desenvolvida nestes últimos anos devido a vários fatores. Entre eles pode-se citar a melhoria técnica e dos aparelhos de ultra-sonografia, a proporção relativamente alta de líquido em relação ao feto nessa fase de gestação, a obtenção de resultado mais precoce e, principalmente, devido a maior fidedignidade que seus resultados apresentam quando comparados à punção de vilosidades coriônicas. Os problemas que ela apresenta são o maior risco de comprometimento fetal, semelhante à punção de vilosidades coriônicas e as dificuldades técnicas de crescimento celular na maioria dos laboratórios, devido à menor quantidade de líquido retirado, com menor quantidade de células. Esse último obstáculo pode ser contornado por uma filtração das células durante a punção, concentrando-as em pequenos volumes. A punção amniótica precoce pode ser realizada a partir da nona semana (Elejalde *et al.*, 1990), mas, preferencialmente, a partir da 13ª semana e um dos critérios muito importante para que haja sucesso no cultivo celular é que o feto possua a distância cabeça-nádegas superior a 37mm (-Byrne *et al.*, 1991).

### **Cordocentese**

A cordocentese foi desenvolvida por Daffos na França em 1983. Esse autor tinha como maior preocupação o diagnóstico de doenças infecto-contagiosas e, dada à liberdade de aborto nesse país, em qualquer fase da gestação, o treinamento para obtenção de sangue de fetos comprometidos pôde ser rapidamente adquirido. Nessa época, a obtenção de sangue fetal por fetoscopia e visualização direta do cordão era difícil e trazia grande risco. Com a melhoria dos aparelhos de ultra-sonografia e as facilidades terapêuticas de transfusão de fetos imunizados, nos quais era possível controlar rapidamente a volemia e o hematócrito, a cordocentese passou a ser um método invasivo de relativo baixo risco (1% em mãos experientes) e de ampla utilização. Desse modo, ela serve não apenas para as situações acima, como também para esclarecer os casos em que o resultado citogenético da anniocentese não foi suficiente e, ainda, para a obtenção,

em 72 horas, do diagnóstico citogenético fetal das gestações que apresentam alguma anomalia congênita detectada à ultra-sonografia (Quadro 2).

A técnica consiste em um minucioso exame ultra-sonográfico para a localização da região de implantação do cordão na placenta, sendo essa região, sempre que possível, a eleita para a cordocentese. Deve-se sempre visualizar os vasos do cordão no sentido longitudinal, o ponto em que a agulha deve penetrar na pele perpendicularmente ao cordão, medir essa distância e, após, locar a sonda do ultra-som de tal modo que se possa ver a ponta da agulha “tocando o cordão”. Esse toque deve ser feito dentro da cavidade amniótica, de tal modo que, se não vier sangue, haverá a penetração de líquido amniótico.

Aliás, para a finalidade de diagnóstico citogenético deve-se sempre, antes da funiculocentese, coletar cerca de 20ml de líquido para garantir a obtenção de cultura de células fetais. Quando a agulha tocar o cordão, faz-se um rápido movimento de introdução da ponta da agulha no mesmo e aspira-se para uma seringa heparinizada de 1 a 3ml. Uma gota desse sangue deve ser transferida para um tubo contendo NaOH a 1/12N. Se essa solução adquirir um tom quase preto, é porque se trata de sangue materno, uma vez que o sangue fetal deverá manter tom róseo. Se a região funicular for de difícil acesso, deve-se procurar outra, em que o cordão se apresente bem visualizado e pouco móvel para realizar esse procedimento. Como essa técnica era mais amplamente aplicada para detecção de doenças infecciosas fetais, o advento do uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permitiu que essa detecção fosse feita mais precocemente com o uso do líquido amniótico. A única grande aplicação da cordocentese, atualmente, tem sido para fins de transfusão intra-uterina. Nesse procedimento, o feto deve ser curarizado, a agulha deve ser firmemente locada e a injeção de sangue deve ser acompanhada pelo borbular dentro do vaso, monitorizado ao ultra-som.

### Fetoscopia

A técnica de fetoscopia consiste na introdução de um endoscópio transabdominal, rígido ou flexível, de 2 a 3mm, com a finalidade de pesquisar a anatomia fetal e de realizar uma biópsia de pele ou a punção do cordão umbilical. Esse procedimento invasivo requer bastante experiência, pois implica risco de perda fetal que oscila de 3

a 5%, além de complicações, como amniorrexis crônica, parto prematuro, infecções e descolamento de placenta. A fetoscopia deve ser utilizada para investigação anatômica em doenças que não podem ser pesquisadas pela ultra-sonografia e cujo sinal anatômico é fundamental para o estabelecimento do diagnóstico síndrome.

A fetoscopia deve ser feita entre 15 e 18 semanas de gestação quando a proporção entre o fluido amniótico e o feto é maior, além do que, nessa fase esse fluido é, ainda, bastante límpido, permitindo melhor visão. Antes da introdução da cordocentese com o auxílio do ultra-som por Daffos, a fetoscopia foi muito utilizada para a obtenção de sangue de cordão, tanto na placa coriônica quanto em outras regiões do cordão umbilical. Nos tempos atuais, essa indicação tem sido abandonada, e a única, que parece pertinente, é aquela que visa ao diagnóstico de alterações dermatológicas ainda impossíveis de detecção por técnicas de biologia molecular.

### Diagnóstico pré-implantação

Com o advento da micromanipulação de gametas e da inseminação do espermatozóide dentro do citoplasma do óvulo (ICSI), está sendo possível a reprodução de indivíduos com oligospermia severa. Nessa situação está a hipoplasia ou agenesia do conduto deferente. Sabe-se que um bom percentual desses indivíduos é heterozigoto ou mesmo homozigoto para uma ou duas mutações do gene da mucoviscidose (fibrose cística do pâncreas). Como a frequência de heterozigotos na população caucasóide é relativamente alta (1/25) deve-se realizar a pesquisa de mutações desse gene no marido e, sendo encontrada uma mutação, a pesquisa deve ser estendida à esposa. Se ambos forem portadores de mutações, poderão realizar o diagnóstico pré-implantação com a biópsia de embrião. Essa biópsia é feita quando o embrião atinge oito células, e tem sido realizado por nós em diferentes diagnósticos. Nas doenças monogênicas utiliza-se a PCR dupla (a primeira com *primers* externos à mutação e a segunda com uma *nested* PCR), que é feita em menos de 24 horas (Wells & Sherlock, 1998) e com apenas uma única célula poderemos estabelecer o diagnóstico do embrião! Nós já a utilizamos em fibrose cística e em talassemia.

A biópsia de embrião tem sido indicada para casais com qualquer tipo de translocação cromossômica, em que se usam sondas fluores-

centes (FISH) que se hibridizam a regiões periteloméricas dos cromossomos envolvidos. A presença de dois sinais de cada cor indica que o embrião é normal ou tem translocação equilibrada. O mesmo não é verdadeiro quando se encontram três sinais de uma cor e um sinal de outra cor. A mesma técnica de FISH (fluorescence *in situ* hybridization) aplicada a regiões centroméricas tem sido usada por nós para diagnóstico de sexo ou mesmo para o diagnóstico das trissomias mais freqüentes. Tanto a técnica da PCR para mutações gênicas, como a de FISH têm sido empregadas em embriões micromanipulados a uma distância superior a 2.000km, sendo este laboratório o pioneiro no mundo em diagnósticos à distância.

Uma técnica bastante promissora é aquela em que se amplifica o genoma de uma única célula milhares de vezes em uma noite (Zhang *et al.*, 1992), e sua amplificação é aplicada a um *micro-array*, permitindo o reconhecimento de várias mutações ou mesmo alterações cromossômicas em apenas um dia. Essas técnicas deverão revolucionar o diagnóstico citogenético e molecular em futuro muito próximo.

## Referências bibliográficas

- Band EB, Thompson W, Elwood JH & Cran GW 1977. Evolution of measurement of maternal plasma alpha-fetoprotein levels as a screening test for fetal neural tube defects. *British Journal Obstetrics and Gynaecology* 84:574-577.
- Beiguelman B 1982a. *Citogenética humana*. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 320 pp.
- Beiguelman B 1982b. El Consejo Genético. 141-152pp. V Congreso Latinoamericano de Genética.
- Benácerraf BR, Bars VA & Laboda LA 1985. A sonographic sign for the detection in the second trimester of the fetus with Down's syndrome. *American Journal Obstetrics and Gynecology* 151:1.078-1.079.
- Brambati B *et al.* 1995. First-trimester Down's syndrome screening using nuchal translucency: a prospective study in patients undergoing chorionic villus sampling. *Ultrasound in Obstetrics and Gynaecology* 5:9-14.

- Brunoni D 1986. Alto risco genético. Aspectos neonatais. *Pediatria Moderna* 21:415-447.
- Burton BK 1988. Elevated maternal serum alpha-feto-protein (MSAFP): interpretation and follow-up. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 31:231-420.
- Buys ML 1990. Prefácio de Birth Defects Encyclopedia. *Blackwell Scientific Publications*. Cambridge, Massachusetts, SA. 1.892 pp.
- Byrne D, Marks K, Cezar G & Nicolaidis K Ranzomized 1991. Study of early amniocentesis versus chorionic villus sampling: a technical and cytogenetic comparison on of 650 patients. *Ultrasound Obstetrics and Gynecology* 1:235-240.
- Comas C *et al.* 1995. First-trimester nuchal edema as a marker of aneuploidy. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 5:26-29.
- Chard T, Lowings C & Kitau MJ 1984. Alphafetoprotein and chorionic gonadotropin levels in relation to Down's syndrome. *Lancet* 2:750.
- Crandall BF 1978. Neural tube defects. Maternal serum screening and prenatal diagnosis. *Pediatric Clinic of North America* 25:619-629.
- Crane JP & Kopta MM 1984. Genetic amniocentesis: impact of placental position upon the risk of pregnancy loss. *American Journal Obstetrics and Gynecology* 150:813-816.
- Cuckle HS, Wald NJ & Thompson SG 1987. Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level. *British Journal Obstetrics Gynaecology* 94:387-402.
- Daffos F, Capella-Pavlovsky M & Forestier F 1983. A new procedure for fetal blood sampling in utero: preliminary results of fifty-three cases. *American Journal Obstetrics Gynecology* 15:985-987.
- Donnenfeld AE & Mennuti MT 1988. Sonografic findings in fetuses with common chromosome abnormalities. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 31:80-96.
- Edmonds DK, Lindsay KS, Miller Williamson E, Wood PJ 1982. Early embryonic mortality in women. *Fertility and Sterility* 38:447-453.
- Elejalde BR & Elejalde M 1986. The prenatal growth of the human body determined by the measurements of bones and organs by ultrasonography. *American Journal of Medical Genetics* 24:575-598.
- Elejalde BR *et al.* 1990. Prospective study of amniocentesis performed between weeks 9 and 16 of gestation: its feasibility risks, complications and use in genetic prenatal diagnosis. *American Journal of Medical Genetics* 35:188-196.
- Golbus MS *et al.* 1979. Prenatal diagnosis in 3.000 amniocenteses. *New England Journal of Medicine* 300:157-163.
- Golbus MS, Stevens ID, Cann HM, Mann J & Hensleigh PA 1982. Rh isoimmunization following genetic amniocentesis. *Prenatal Diagnosis* 2:149-153.
- Gustavii B 1984. Chorionic biopsy and miscarriage in first trimester. *Lancet* 1:562.
- Hahnemann N & Mohr J 1969. Antenatal foetal diagnosis in genetic disease. *Bulletin European Society Human Genetics* 3:47-54.
- Hahnemann N & Mohr J 1968. Genetic Diagnosis on the embryo means of biopsy from extraembryonic membranes. *Bulletin European Society Human Genetics* 28:23-29.
- Hassold T & Chiu D 1985. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Human Genetics* 70:11-17.
- Hata T & Deter RL 1992. A review of fetal organ measurements obtained with ultra-sound: normal growth. *Journal of Clinical Ultrasound* 20:155-174.
- Hogge,WA, Schonberg SA & Golbus MS 1986. Chorionic villus sampling: Experience of the first 1000 cases. *American Journal Obstetrics Gynaecology* 154:1.249-1.252.
- Hsu LYF 1986. Prenatal diagnosis of chromosome abnormalities, pp. 115-185. In Aubrey Milunsky. *Genetic disorders and the fetus*. Plenum Publishing Corporation.
- Kalousek DK 1985. Mosaicism confined to chorionic tissue in human gestations, pp. 130-136. In Fraccaro, M.; Simoni, G. e Brambati B. *First trimester fetal diagnosis*. Editora B. Springer-Verlag, Nova York.
- Kan YN *et al.* 1974. Concentration of fetal red blood cells from a mixture of maternal and fetal blood by anti-i serum and aid to prenatal diagnosis of haemoglobinopathies. *Blood* 43:411-415.
- Knight GJ, Palomaki GE & Haddow JE 1988. Use of maternal serum alpha-fetoprotein measurements to screen for Down's Syndrome. *Clinical Obstetrics Gynecology* 31:306-327.
- Kurtz AB, Wapner RJ, Rubin CS, Cole-Beuglet Cross DR & Goldberg BB 1980. Ultrasound criteria for in utero diagnosis of microcephaly. *Journal Clinics Ultrasound* 8:11-16.
- Martin RH *et al.* 1983. The chromosome constitution of 1.000 human spermatozoa. *Human Genetics* 63:305-309.
- Mastroiacovo P & Cavalcanti DP 1991. *Lancet* 337:1.091pp.
- McKusick VA 1992. *Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive and X-Linked phenotypes*. Ed.The Johns Hopkins University. Baltimore, Maryland. 2.320 pp.
- Milner R, Johnston M, Taylor M & Hamerton JL 1989. Multicentre randomised clinical trial of chorion villus sampling and amniocentesis. *Lancet*:1-6.
- Milunsky A 1979. Sex chromosome and X-linked disorders, pp. 157-208. In Milunsky A. *Genetic disorders and the fetus*. Plenum Press, Nova York.
- Mohr J 1968. Foetal genetic diagnosis: development of techniques for early sampling of foetal cells. *Acta Pathology Microbiology Scandinav* 73:73-77.
- Nazareth HRS, Pinto Jr W & Andrade JAD 1981. Diagnóstico pré-natal de aberrações cromossômicas. Primeira experiência brasileira. *Revista Brasileira de Genética* IV 3: 459-470.
- Nicolaidis KH, Azar G, Byrne D, Mansur C & Marks K 1992. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *British Medicine Journal* 304:867-869.
- Palmer CG *et al.* 1987. Fetal karyotype following ascertainment of fetal anomalies by ultrasound. *Prenatal Diagnosis* 7:551-555.
- Pandya PP, Kondylis A, Hilbert L, Snijders RJM & Nicolaidis HK 1995. Chromosomal defects and outcome in 1.015 fetuses with increased nuchal translucency. *Ultrasound in Obstetrics and Gynaecology* 5:15-19.
- Pavani MAM, Pellegrinetti B & Pinto Jr W 1981. Avaliação do peso e da estatura fetal pelo ultra-som, utilizando-se vários parâmetros. *Jornal Brasileiro de Ginecologia* 91:185-188.
- Pinto CF 1993. Significado do fluido amniótico meconial

- no segundo trimestre da gestação. Mestrado em Genética. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Pinto Jr W *et al.* 1987. Diagnóstico pré-natal e genético. *Neurologia Infantil*. Belo Horizonte, 74-82 pp.
- Plachot M *et al.* 1987. From oocyte to embryo: a model deduced from in vitro fertilization, for natural selection against chromosome abnormalities. *Annales Génétique* 30(1): 22-32.
- Ramalho AS 1986. *As hemoglobinopatias hereditárias. Um problema de saúde pública no Brasil*. Editora Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto.
- Schlesselman JJ 1979. How does one assess the risk of abnormalities from human in vitro fertilization? *American Journal Obstetrics Gynecologies* 135:135-148.
- Schröder J & De La Chapelle A 1972. Fetal lymphocytes in the maternal blood. *Blood* 39(2):153-162.
- Simoni G *et al.* 1983. Efficient direct chromosome analysis and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. *Human Genetics* 1983:349-357.
- Simoni G *et al.* 1985. Discordance between pre-natal cytogenetic diagnosis after chorionic villi sampling and chromosomal constitution of the fetus, 137-143pp. In Fraccaro M, Simoni G, Brambati B (ed.). *First trimester fetal diagnosis*. Springer-Verlag, Nova York, 355 pp.
- Simoni G, Fraccaro M, Gimelli G, Maggi F & Bricarelli FD 1987. False-positive and false negative findings on chorionic villus sampling. *Prenatal Diagnosis* 7: 671-672.
- Simpson JL & Elias S 1993. Isolating fetal cells from maternal blood. *JAMA* 270(19):2.357-2.361.
- Tabor A, Jerne D & Bock JE 1986. Incidence of rhesus immunization after genetic amniocentesis. *British Medical Journal* 293:533-536.
- Wald NJ & Hackshaw AK 1997. Combining ultrasound and biochemistry in first-trimester screening for Down's syndrome. *Prenatal Diagnosis* Sep 17(9): 821-829.
- Wald NJ *et al.* 1992. Antenatal maternal serum screening for Down's syndrome: results of a demonstration project. *British Medical Journal* 305:391-394.
- Wald NJ *et al.* 1988. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *British Medical Journal* 297:883-887.
- Wald NJ, George L, Smith D, Densem JW & Petterson K 1996. On behalf of the International Prenatal Screening Research Group. Serum screening for Down's syndrome between 8 and 14 weeks for pregnancy. *British Journal Obstetrics and Gynaecology* 103:407-412.
- Wald N *et al.* 1991. Prevention of neural tube defects; Result of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 338:131-137.
- Warren RC, Butler J, Morsman JM, Mckenzie C & Rodek C.H 1985. Does chorionic villus sampling cause fetomaternal haemorrhage? *Lancet I*: 201.
- Weaver DD 1988. A survey of prenatally diagnosed disorders. *Clinical Obstetrics Gynecologies* 31:231-420.
- Wells D & Sherlock JK 1998. Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification. *Prenatal Diagnosis* 18:1.389-1.401
- Ximenes RLS *et al.* 1997. Translucência Nucal e Associação com Anomalias Cromossômicas. *27ª Jornada Paulista de Radiologia*. Palácio de Convenções do Anhembi, São Paulo.
- Zhang L *et al.* 1992. Whole Genome Amplification from a single cell-implication for genetic analysis. *Proceedings Natural Academy Science USA* 89:5.847-5.851.