

Análise dos resultados maternos e fetais dos procedimentos invasivos genéticos fetais: um estudo exploratório em Hospital Universitário

MARIO KOHATSU¹, MÁRIO HENRIQUE BURLACCHINI DE CARVALHO², ROSSANA PULCINELI VIEIRA FRANCISCO², ANTÔNIO GOMES DE AMORIM FILHO³, MARCELO ZUGAIB⁴

¹ Mestre em Ciências, Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP, Brasil

² Professores Livre-docentes, Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, FMUSP, São Paulo, SP, Brasil

³ Médico-assistente, Clínica Obstétrica, Hospital das Clínicas, FMUSP, São Paulo, SP, Brasil

⁴ Professor Titular de Obstetrícia, FMUSP, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

Objetivo: Caracterizar as indicações das gestantes que procuraram o serviço de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para realização de procedimentos invasivos diagnósticos e avaliar os resultados dos cariótipos fetais e de suas gestações. **Métodos:** Estudo observacional retrospectivo das gestantes que realizaram biópsia de vilos coriônicas (BVC), amniocentese e cordocentese no período de fevereiro de 2005 a dezembro de 2009. Não foram incluídos outros procedimentos diagnósticos ou procedimentos terapêuticos. O resultado da gestação foi obtido através de consulta de prontuário eletrônico e/ou físico e/ou contato telefônico. **Resultados:** Foram realizados 713 procedimentos (113 BVC, 340 amniocenteses e 260 cordocenteses). A principal indicação para a realização dos procedimentos invasivos foi a presença de alterações estruturais nos fetos, seguido por valores aumentados da translucência nuchal e pela idade materna avançada. O cariótipo fetal esteve alterado em 186 casos (26,1%). A trissomia do cromossomo 18 foi a aneuploidia mais comum, seguida pela trissomia do 21, a monossomia do X e a trissomia do cromossomo 13. Ocorreram 4,9% de abortamento, 25,7% de natimortos e 13% de neomortos. Oito gestantes optaram pela interrupção judicial, e 99% das gestantes cujos fetos não apresentavam malformação e que apresentavam cariótipo fetal normal tiveram nativos.

Unitermos: Cariótipo; amostra de vilosidade coriônica; sangue fetal; feto.

©2012 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

SUMMARY

Analysis of fetal and maternal results from fetal genetic invasive procedures: an exploratory study at a University Hospital

Objective: To characterize the indications of pregnant women who sought the Fetal Medicine Services of the Hospital das Clínicas, at the Medical School of the Universidade de São Paulo for performing invasive diagnostic procedures, and to evaluate the results of fetal karyotypes and their pregnancies. **Methods:** A retrospective and observational study on pregnant women who underwent chorionic villus sampling (CVS), amniocentesis, and cordocentesis in the period from February, 2005 to December, 2009. Other diagnostic or therapeutic procedures were not included. The result of pregnancy was obtained by consulting patient electronic records, medical records, and/or telephone call. **Results:** 713 procedures were performed (113 CVS, 340 amniocenteses, and 260 cordocenteses). The main indication for performing invasive procedures was the presence of structural changes in fetuses, followed by increased values of nuchal translucency, and advanced maternal age. Fetal karyotype was altered in 186 cases (26.1%). The 18 trisomy was the commonest aneuploidy followed by the 21 trisomy, X monosomy, and 13 trisomy. There were 4.9% cases of miscarriage, 25.7% cases of stillborn infants, and 13% cases of neonatal deaths. Eight pregnant women opted for legally induced abortion. 99% of pregnant women whose fetuses did not present abnormalities and presented normal fetal karyotype had infants who were born alive.

Uniterms: Karyotype; chorionic villus sampling; fetal blood; fetus.

©2012 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Artigo recebido: 23/05/2012
Aceito para publicação: 30/06/2012

Correspondência para:
Mário Henrique Burlacchini
de Carvalho
Departamento de Obstetrícia
e Ginecologia
Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255
Instituto Central, 10º andar
São Paulo, SP, Brasil
CEP: 05403-000
Tel: +55 11 2661-6209
marioburlacchini@uol.com.br

Conflito de interesse: Não há.

INTRODUÇÃO

O rastreamento para aneuploidia no pré-natal iniciou-se na década de 1970, tendo como a principal indicação a idade materna¹.

O risco para anormalidades cromossômicas aumenta com o avanço da idade materna. Estudo que avaliou aproximadamente 89 mil amniocentese clássicas demonstrou que gestantes com idade igual ou superior a 35 anos apresentavam mais alterações cromossômicas que aquelas com idade inferior. As frequências, para aquelas com idade superior a 35 anos, para trissomia dos cromossomos 21, 18 e 13 foram respectivamente: 1/100, 1/454 e 1/1.438. Já a frequência para aquelas com idade inferior a 35 anos foi de 1/591, 1/2862 e 1/4651 para as mesmas aneuploidias². A utilização da idade materna maior ou igual a 35 anos, como ponto de corte para indicação para pesquisa do cariótipo fetal, apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 30%.

Na década de 1990, iniciou-se o rastreamento bioquímico de segundo trimestre com a avaliação da alfafeto-proteína, betagonadotrofina coriônica (β -HCG) e estriol não conjugado do plasma materno, com sensibilidade de 60% para uma taxa de falso positivo de 5% para trissomia do 21³. Com a melhoria dos equipamentos de ultrassonografia, o rastreamento foi antecipado para o primeiro trimestre por meio da avaliação da translucência nucal. A taxa de detecção da síndrome de Down por meio da translucência nucal é de 77% para um falso positivo de 5%⁴. A associação da translucência nucal com a dosagem das proteínas no sangue materno, a fração livre da betagonadotrofina coriônica (β -HCG livre) e proteína plasmática A específica da gestação (PAPP-A) elevam a sensibilidade para 90% com a mesma taxa de falso positivo^{5,6}. Outro benefício do rastreamento combinado é a redução de casos com indicação de procedimento invasivo, reduzindo a exposição de gestantes ao risco do procedimento⁷.

O exame ultrassonográfico morfológico também pode ser usado para o rastreamento de anomalias cromossômicas no segundo trimestre da gestação. As malformações, tais como ventriculomegalia, fenda facial, cardiopatia, hérnia diafragmática, uropatia, onfalocele, encurtamento de membros e pé torto, também podem estar relacionadas com aneuploidia^{8,9}.

O diagnóstico definitivo de anormalidade cromossômica no período antenatal só é possível com a realização de procedimentos invasivos e análise de tecidos fetais ou de seus anexos, como trofoblasto, líquido amniótico e sangue fetal¹⁰.

A biópsia de vilos coriais (BVC) apresenta um risco de perda fetal total que varia de 2,3% a 3,7%¹¹⁻¹³. Estas taxas levam em consideração a precocidade da realização do procedimento e, por consequência, a presença, neste grupo, de fetos cromossomicamente alterados que

evoluiriam para abortamento espontâneo. A vantagem desse exame é a idade gestacional precoce do diagnóstico. A principal desvantagem é o mosaicismismo confinado à placenta, que ocorre em aproximadamente 1% dos casos e há necessidade de repetição do procedimento em outro meio (líquido amniótico ou sangue fetal)^{14,15}. A amniocentese clássica oferece um risco de perda fetal de 0,3% a 1,0%¹⁶⁻¹⁸. A cordocentese é um procedimento que permite, além da avaliação do cariótipo fetal, o diagnóstico de anemia, infecções e hemoglobinopatias fetais. Esse procedimento tem risco de 1,4% de perda fetal¹⁹.

Na Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), o serviço de Medicina Fetal é referência para casos de fetos com malformação ou risco aumentado para aneuploidias. O serviço realiza procedimentos invasivos para estudo do cariótipo fetal tanto para os casos diagnosticados no próprio serviço ou referenciados de serviços externos. Entretanto, os dados relativos aos procedimentos fetais, resultados dos cariótipos e evolução das gestantes que se submeteram ao procedimento invasivo ainda não foram publicados, assim como os dados nacionais são escassos. A publicação desses dados é de relevância por representar um serviço de referência da cidade de São Paulo e fornecer informações próprias para o aconselhamento de futuras gestantes tanto no plano local quanto nacional.

O objetivo principal deste estudo foi caracterizar as indicações das gestantes que procuraram o serviço de Medicina Fetal de um centro terciário para a realização de procedimentos invasivos para estudo do cariótipo fetal. Os objetivos secundários foram de avaliar os resultados dos cariótipos fetais e suas gestações.

MÉTODOS

Foi realizado um estudo observacional retrospectivo, de corte transversal no setor de Medicina Fetal da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (CaPPesq – HCFMUSP), número 0600/09.

Foram selecionadas gestantes que realizaram procedimentos invasivos (biópsia de vilos coriais, amniocentese e cordocentese) no período de fevereiro de 2005 a dezembro de 2009.

As grávidas foram encaminhadas de outros serviços de Medicina Fetal ou da própria instituição. Após aconselhamento genético e explicação dos riscos relacionados com o procedimento, a própria gestante ou responsável legal assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido quando optaram pela realização. Antes da realização do procedimento invasivo, todas as gestantes foram submetidas à ultrassonografia morfológica para avaliação estrutural fetal.

Foram incluídas apenas as gestantes submetidas a procedimentos invasivos diagnósticos para cariótipo fetal (biópsia de vilos coriais, amniocentese e cordocentese). A biópsia de vilos coriais foi realizada entre a 11ª e a 14ª semanas e 6 dias, a amniocentese a partir de 14 semanas e a cordocentese foi realizada a partir de 19 semanas de gestação.

Não foram incluídos os procedimentos com outras finalidades, tais como amniodrenagem, colocação de drenos, *laser* ou punções para cariótipo fetal coletado de outras serosidades.

O levantamento das gestantes submetidas aos procedimentos invasivos foi realizado por consulta ao banco de dados do Sistema Informatizado de Laudos em Obstetrícia e Ginecologia (SILOG) que é utilizado pelo setor de Medicina Fetal para laudo dos exames ultrassonográficos, procedimentos invasivos, resultados de exames fetais e da gestação. Os resultados pós-natais foram obtidos através de consulta dos prontuários médicos em papel do Hospital das Clínicas e no SILOG e/ou por meio de contato telefônico com as pacientes.

Foram avaliadas as características da população quanto à idade das pacientes, indicações para a realização dos procedimentos invasivos, número e tipos dos procedimentos realizados (biópsia de vilos coriais, amniocentese e cordocentese), resultado do cariótipo fetal e evolução das gestações (interrupção judicial e não judicial, aborto espontâneo, definido como a perda da gestação até 20 semanas de gestação; natimorto, definido como nascimento de feto morto após 20 semanas de gestação e neomorto, diante da ocorrência de morte do recém-nascido até a 28 dias pós-nascimento²⁰).

As variáveis numéricas foram descritas como máximas, mínimas, média e desvio-padrão ou mediana. Quanto às variáveis categóricas, utilizaram-se frequências simples e relativas.

RESULTADOS

No período estudado, foram realizados 713 procedimentos invasivos diagnósticos, sendo 113 biópsias de vilos coriais, 340 amniocenteses e 260 cordocenteses. A Tabela 1 descreve as indicações para a realização dos procedimentos invasivos diagnósticos para os procedimentos realizados no período de estudo.

Com relação à BVC, a idade materna para realização do procedimento variou de 15 a 45 anos, com média de 32,4 ($\pm 7,7$) anos. A idade gestacional média de realização foi de 13,4 ($\pm 1,3$) semanas de gestação.

No grupo de gestantes submetidas à amniocentese, a idade materna para a realização do procedimento variou de 14 a 47 anos, apresentando média de 30,7 ($\pm 8,2$) anos. A idade gestacional da realização dos procedimentos variou de 14,3 a 34 semanas com média de 20,1 ($\pm 3,6$) semanas. Entre os casos de amniocentese, foi observado um caso de morte materna após 22 dias da realização do procedimento, em gestante de alto risco com diagnóstico de anemia falciforme na forma SS.

Com relação à cordocentese, a idade materna variou de 13 a 48 anos, com média de 28 ($\pm 7,5$) para realização do procedimento. A idade gestacional média de realização foi de 27,1 ($\pm 3,6$) semanas de gestação.

Das gestantes submetidas à cordocentese 53,5% (139/260) delas obtiveram filhos vivos, 24,6% (64/260) das gestantes tiveram natimortos, 20,8% (54/260) das gestantes tiveram neomortos e 1,6% (3/260) das gestantes optaram pela interrupção judicial.

A Tabela 2 mostra os resultados dos cariótipos fetais dos casos submetidos à realização de procedimentos invasivos no serviço de Medicina Fetal da Clínica Obstétrica do HCFMUSP no período estudado.

O resultado das gestações das pacientes que se submeteram a procedimentos invasivos é mostrado na Tabela 3.

Tabela 1 – Indicações para realização dos procedimentos invasivos para pesquisa de cariótipo fetal. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, HCFMUSP, 2005 a 2009

Indicação	BVC (n = 113) n (%)	Amniocentese (n = 340) n (%)	Cordocentese (n = 260) n (%)
Malformação fetal	26 (23,0%)	227 (66,8%)	245 (94,3%)
TN aumentada	64 (56,7%)	29 (8,5%)	03 (1,2%)
Idade materna	20 (17,7%)	49 (14,4%)	04 (1,5%)
Marcador ultrassonográfico de 2º trimestre	00	24 (7,1%)	03 (1,2%)
Falha de cultura	00	02 (0,6%)	04 (1,5%)
Antecedente de aneuploidia	02 (1,7%)	05 (1,5%)	00
Pais com cromossomopatia	01 (0,9%)	02 (0,6%)	00
Ansiedade	00	01 (0,3%)	00
Filho anterior com malformação	00	01 (0,3%)	00
Mosaicismo em líquido amniótico	00	00	01 (0,4%)

BVC, biópsia de vilos coriais; TN, translucência nucal.

Tabela 2 – Resultados dos cariótipos fetais dos casos submetidos a procedimentos invasivos diagnósticos

Procedimento/cariótipo	BVC n (%)	Amniocentese n (%)	Cordocentese n (%)	Total n (%)
Normal	77 (68,2%)	214 (63%)	187 (67,3%)	478 (67%)
T13	03 (2,6%)	12 (3,5%)	12 (4,6%)	27 (3,8%)
T18	09 (8,0%)	30 (8,8%)	19 (7,3%)	58 (8,1%)
T21	10 (8,8%)	20 (5,9%)	14 (5,4%)	44 (6,2%)
Monossomia do X	06 (5,3%)	24 (7,1%)	04 (6,2%)	34 (4,8%)
Triploidia	0	04 (1,2%)	01 (0,4%)	05 (0,7%)
Outra aneuploidia	01 (0,9%)	08 (2,3%)	10 (3,8%)	19 (2,7%)
Falha de cultura	07 (6,2%)	28 (8,2%)	13 (5,0%)	48 (6,7%)

BVC, biópsia de vilos coriais.

Tabela 3 – Resultados das gestações que realizaram procedimento invasivo para estudo do cariótipo fetal

Procedimento/resultado	BVC 113 n (%)	Amniocentese 340 n (%)	Cordocentese 260 n (%)	Total 713 n (%)
Óbito intrauterino total	39 (34,5%)	125 (36,8%)	67 (25,8%)	231(32,4%)
Óbito intrauterino total associado à malformação fetal ou cariótipo anormal	39 (34,5%)	124 (36,4%)	67 (25,8%)	230 (32,2%)
Interrupção judicial	01 (0,9%)	04 (1,2%)	03 (1,2%)	8 (1,1%)
Óbito neonatal	03 (2,6%)	36 (10,6%)	52 (20%)	91 (12,8%)
Vivo	71 (62,9%)	179 (52,6%)	141 (54,2%)	391 (54,8%)

BVC, biópsia de vilos coriais; Óbito intrauterino total: soma de óbitos intrauterinos associados à malformação fetal ou cariótipo anormal e interrupção judicial. Óbito intrauterino total associado à malformação fetal ou cariótipo anormal: total de óbito intrauterino com malformação ou cariótipo fetal anormal incluindo as interrupções judiciais de fetos alterados.

A Tabela 4 descreve as principais malformações fetais que evoluíram com óbito intraútero.

DISCUSSÃO

As pacientes que foram encaminhadas ao serviço de Medicina Fetal da Clínica Obstétrica do HCFMUSP em sua maioria apresentavam alterações morfológicas fetais, uma vez que este foi o principal motivo na realização dos procedimentos invasivos para cariótipo fetal, representando 69,8% das indicações.

As proporções das indicações para a realização dos procedimentos diferem da literatura, e as anormalidades estruturais representam até 12% na maioria dos estudos^{8,14,21,22}. Essa diferença entre as indicações pode ser em razão de fatores como inexistência de política pública de rastreamento de anormalidades cromossômicas, dificuldade de acesso a serviços que ofereçam exames diagnósticos, receio das pacientes de resultados adversos após a realização dos procedimentos, impossibilidade ou limitação a tratamento após alguns diagnósticos, além do estudo ter

Tabela 4 – Descrição das malformações por sistema fetal dos casos que evoluíram para óbito intraútero

Procedimento/malformação fetal	BVC	Amniocentese	Cordocentese	Total
Hidropsia	10	23	9	42
Sistema nervoso	3	17	15	35
Pulmonar	0	2	2	4
Coração	3	5	4	12
Aparelho digestório	0	1	1	2
Defeito de parede abdominal	1	4	3	8
Sistema urinário	2	3	4	9
Displasia esquelética	1	7	3	11
Total	20	62	41	123

BVC, biópsia de vilos coriais.

sido realizado em centro terciário para onde são encaminhados casos com malformações e, por vezes, já em fase adiantada da gestação. A idade materna de 35 anos ou mais foi, no passado, a principal indicação para procedimentos invasivos nos países desenvolvidos. Atualmente, essa indicação foi substituída pelo resultado do risco individual dos testes de rastreamento no 1º trimestre, por meio da medida da translucência nucal combinada ou não ao rastreamento bioquímico (BHCG livre e PAPP-A). No presente estudo, a idade materna de 35 anos ou mais representou 10,2% das indicações e o rastreamento ultrassonográfico do 1º trimestre, representado pela translucência aumentada 13,5%, representando a segunda e a terceira indicações mais comuns. As demais indicações observadas, a saber antecedente de aneuploidias, pais com cromossomopatias, filho anterior com malformação, tiveram frequências semelhantes da literatura^{23,24}.

Neste estudo também se observa diferença entre outros estudos devido ao número muito alto de anormalidades cromossômicas encontradas (27,1%) quando comparado a outros estudos, que revelam taxas de anormalidades cromossômicas de até 14%^{8,14,22}. Essa taxa não pode ser considerada para a população geral, já que se trata de um serviço de referência, para onde as pacientes são encaminhadas para possível diagnóstico e aconselhamento.

Outra diferença observada com relação à literatura é a taxa de falha de cultura, que foi de 6,7% (48/713). A literatura relata taxas inferiores a 1,0%^{14,15,25,26}. Essa taxa pode estar relacionada com problemas técnicos da coleta, por ser um hospital de ensino, mas também indica a necessidade de revisão das rotinas laboratoriais. Entre os casos de falha de cultura, em apenas seis foi realizada nova punção. Foram observados cinco óbitos intraútero entre os casos de falha de cultura entre a punção e o retorno para resultado do cariótipo fetal. Em 41 casos, a falha ocorreu em análise do cariótipo fetal em líquido amniótico ou cordocentese. A idade gestacional avançada nesses procedimentos, aproximadamente de 20 semanas para amniocentese e 27 semanas para cordocentese, época em que a gestante começa a sentir os movimentos fetais, pode ter influenciado na decisão de não realização de nova punção pelo medo da perda maior em idade gestacional avançada.

Resultados adversos como abortamento espontâneo, natimortos e neomortos também apresentaram taxas altas, respectivamente 4,9%, 25,7%, e 13% (quando comparadas às de outros estudos), provavelmente por causa da grande proporção de fetos com malformações e anormalidades cromossômicas, além da não existência de lei para interrupção da gestação em casos de fetos malformados. Em 11 países europeus, a interrupção da gestação por indicação fetal é permitida independente da idade gestacional²⁷. Na literatura, são descritas taxas de abortamento espontâneo de 0,35% a 2,58%, de natimortos de 0,35% a 1,0%, neomortos de 0% a 8,33%^{14,17,21,28-30}. Antsaklis *et al.*³⁰ reportam em

fetos com alteração ultrassonográfica submetidos a cordocentese 15,5% de óbito intraútero e 8,33% de óbitos neonatais. Tais taxas são inferiores às observadas no presente estudo, mesmo que incluídos apenas fetos com alterações ultrassonográficas, provavelmente demonstrando a gravidade em que tais conceitos são encaminhados ao serviço.

O conhecimento do cariótipo fetal permitiu aconselhamento das gestantes. Em alguns casos, permitiu que as gestantes tomassem decisões que julgaram mais adequadas em sua gravidez, optando pela interrupção judicial, obtidas por liminar judicial em casos de anormalidades cromossômicas incompatíveis com a vida extrauterina. Para gestantes cujos fetos eram portadores de malformações graves incompatíveis com a vida, alterações cromossômicas ou quando apresentavam necessidade de suporte psicológico, foi oferecido acompanhamento psicológico. O conhecimento do cariótipo fetal também permitiu a adequada programação da via de parto.

No estudo realizado, ocorreu um óbito de uma paciente que realizou amniocentese com 16 semanas e 5 dias de gestação. A indicação para a realização do procedimento foi a presença de onfalocele e cardiopatia fetal. O resultado do cariótipo foi 46, XY. A paciente foi internada após 15 dias e alta após 1 semana de antibioticoterapia por pneumonia. O óbito ocorreu após 22 dias da realização da amniocentese. A morte materna provavelmente não deve estar relacionada com o procedimento invasivo, pois a gestante apresentava anemia falciforme, forma SS, e outras interações nesta gravidez em virtude de crises algicas, necessitando de hemotransfusão. As mortes relacionadas com procedimentos invasivos são eventos que ocorrem após sepse materna de início em até 30 horas após o procedimento³¹, fato que não parece estar relacionado com esta paciente.

Entre as gestantes com cariótipo fetal normal e sem alterações estruturais, os resultados gestacionais foram superiores, com uma sobrevida de 99% (95/96) entre todos os casos submetidos a procedimentos invasivos.

CONCLUSÃO

A obtenção do cariótipo fetal é um importante exame diagnóstico que deveria ser oferecido a todas após aconselhamento genético e o teste de rastreamento. O procedimento invasivo apresenta risco de perda da gestação; entretanto, o presente estudo demonstra que a maioria das perdas fetais esteve relacionada com a condição fetal subjacente (malformações fetais e aneuploidias). Apenas um caso evoluiu com óbito intrauterino sem malformação fetal ou cariótipo anormal. O Hospital Universitário ainda tem as malformações como a principal indicação para pesquisa do cariótipo fetal e os casos são encaminhados em idade gestacional avançada, o que deve ser responsável pelo número elevado de cordocenteses (36,4%) para avaliação do cariótipo fetal.

REFERÊNCIAS

1. Canadian guidelines for antenatal diagnosis of genetic disease: a joint statement. *Can Med Assoc J*. 1974;111(2):180-3.
2. Forabosco A, Percesepe A, Santucci S. Incidence of non-age-dependent chromosomal abnormalities: a population-based study on 88965 amniocenteses. *Eur J Hum Genet*. 2009;17(7):897-903.
3. Burton BK, Prins GS, Verp MS. A prospective trial of prenatal screening for Down syndrome by means of maternal serum alpha-fetoprotein, human chorionic gonadotropin, and unconjugated estriol. *Am J Obstet Gynecol*. 1993;169(3):526-30.
4. Snijders RJ, Noble P, Sebire N, Souka A, Nicolaides KH. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. Fetal Medicine Foundation First Trimester Screening Group. *Lancet*. 1998;352(9125):343-6.
5. Spencer K, Souter V, Tul N, Snijders R, Nicolaides KH. A screening program for trisomy 21 at 10-14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1999;13(4):231-7.
6. Nicolaides KH, Brizot ML, Snijders RJ. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for fetal trisomy in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*. 1994;101(9):782-6.
7. Nicolaides KH. Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191(1):45-67.
8. Nicolaides KH, Snijders RJ, Gosden CM, Berry C, Campbell S. Ultrasonographically detectable markers of fetal chromosomal abnormalities. *Lancet*. 1992;340(8821):704-7.
9. Benacerraf BR, Nadel A, Bromley B. Identification of second-trimester fetuses with autosomal trisomy by use of a sonographic scoring index. *Radiology*. 1994;193(1):135-40.
10. Ball RH. Invasive fetal testing. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2004;16(2):159-62.
11. Jackson LG, Zachary JM, Fowler SE, Desnick RJ, Golbus MS, Ledbetter DH *et al*. A randomized comparison of transcervical and transabdominal chorionic-villus sampling. The U.S. National Institute of Child Health and Human Development Chorionic-Villus Sampling and Amniocentesis Study Group. *N Engl J Med*. 1992;327(9):594-8.
12. Brambati B, Lanzani A, Tului L. Transabdominal and transcervical chorionic villus sampling: efficiency and risk evaluation of 2,411 cases. *Am J Med Genet*. 1990;35(2):160-4.
13. Smidt-Jensen S, Permin M, Philip J, Lundsteen C, Zachary JM, Fowler SE *et al*. Randomised comparison of amniocentesis and transabdominal and transcervical chorionic villus sampling. *Lancet*. 1992;340(8830):1237-44.
14. Brambati B, Tului L, Cislighi C, Alberti E. First 10,000 chorionic villus samplings performed on singleton pregnancies by a single operator. *Prenat Diagn*. 1998;18(3):255-66.
15. Sundberg K, Bang J, Smidt-Jensen S, Brocks V, Lundsteen C, Parner J *et al*. Randomised study of risk of fetal loss related to early amniocentesis versus chorionic villus sampling. *Lancet*. 1997;350(9079):697-703.
16. Crandall BF, Howard J, Lebherz TB, Rubinstein L, Sample WF, Sarti D. Follow-up of 2000 second-trimester amniocenteses. *Obstet Gynecol*. 1980;56(5):625-8.
17. Tabor A, Philip J, Madsen M, Bang J, Obel EB, Nørgaard-Pedersen B. Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. *Lancet*. 1986;1(8493):1287-93.
18. Midtrimester amniocentesis for prenatal diagnosis. Safety and accuracy. *JAMA*. 1976;236(13):1471-6.
19. Tongsong T, Wanapirak C, Kunavikaturkul C, Sirirachotiyakul S, Piyamongkol W, Chanprapaph P. Fetal loss rate associated with cordocentesis at midgestation. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;184(4):719-23.
20. Bittar RE, Miyadahira S, Zugaib M. Obstetria: conceito e desafios. In: Zugaib M. Zugaib obstetria. Barueri: Manole; 2012. p. 3-14.
21. Odibo AO, Gray DL, Dicke JM, Stamilio DM, Macones GA, Crane JP. Revisiting the fetal loss rate after second-trimester genetic amniocentesis: a single center's 16-year experience. *Obstet Gynecol*. 2008;111(3):589-95.
22. Mademont-Soler I, Morales C, Clusellas N, Soler A, Sánchez A, Group of Cytogenetics from Hospital Clinic de Barcelona. Prenatal cytogenetic diagnosis in Spain: analysis and evaluation of the results obtained from amniotic fluid samples during the last decade. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011;157(2):156-60.
23. Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal Diagn Ther*. 2010;27(1):1-7.
24. Akolekar R, Bower S, Flack N, Bilardo CM, Nicolaides KH. Prediction of miscarriage and stillbirth at 11-13 weeks and the contribution of chorionic villus sampling. *Prenat Diagn*. 2011;31(1):38-45.
25. Sikkema-Raddatz B, Bouman K, Verschuuren-Bemelmans CC, Stoepker M, Mantingh A, Beekhuis JR *et al*. Four years' cytogenetic experience with the culture of chorionic villi. *Prenat Diagn*. 2000;20(12):950-5.
26. Nagel HT, Vandenbussche FP, Keirse MJ, Oepkes D, Oosterwijk JC, Beverstock G *et al*. Amniocentesis before 14 completed weeks as an alternative to transabdominal chorionic villus sampling: a controlled trial with infant follow-up. *Prenat Diagn*. 1998;18(5):465-75.
27. Gissler M, Fronteira I, Jahn A, Karro H, Moreau C, Oliveira da Silva M *et al*. Terminations of pregnancy in the European Union. *BJOG*. 2012;119(3):324-32.
28. Tabor A, Vestergaard CH, Lidsgaard Ø. Fetal loss rate after chorionic villus sampling and amniocentesis: an 11-year national registry study. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2009;34(1):19-24.
29. Pitukijronnakorn S, Promsonthi P, Panburana P, Udomsubpayakul U, Chittacharoen A. Fetal loss associated with second trimester amniocentesis. *Arch Gynecol Obstet*. 2010;284(4):793-7.
30. Antsaklis A, Daskalakis G, Papantoniou N, Michalas S. Fetal blood sampling-indication-related losses. *Prenat Diagn*. 1998;18(9):934-40.
31. Erez Y, Ben-Shushan A, Elchalal U, Ben-Meir A, Rojansky N. Maternal morbidity following routine second trimester genetic amniocentesis. *Fetal Diagn Ther*. 2007;22(3):226-8.