

# **Técnicas Invasivas de Diagnóstico e Terapêutica Embrio-Fetal**

**Bruno Luís Feitais Proença**

**Mestrado Integrado em Medicina- Ano lectivo 2013/2014**

**Artigo de Revisão Bibliográfica**

**Orientadora: Dr<sup>a</sup> Rosa Zulmira Rocha Pereira Vaz de Macedo**

## RESUMO

O propósito desta revisão bibliográfica é avaliar o actual estado de arte da medicina materno fetal, mais concretamente das actuais técnicas invasivas de diagnóstico e terapêutica embrio-fetal.

As várias técnicas incluem a biopsia de vilosidades coriônicas, amniocentese, amostra de sangue fetal através das diferentes abordagens (cordocentese, punção hepática e cardiocentese).

Para estas técnicas serão feitas referencias adequadas dos estudos epidemiológicos mais pertinentes, avaliando as indicações, sensibilidade e especificidade de cada técnica, os riscos, complicações, contra-indicações. A importante comparação entre cada uma das técnicas também será feita.

Também será falado acerca da fetoscopia, e, sendo esta a mais recente das técnicas invasivas carece de suporte epidemiológico. No entanto foi esta mesma técnica que permitiu a revolução médica inimaginável até então. Terapêutica cirúrgica fetal *in útero*, no decorrer da gravidez. As várias aplicações da técnica serão faladas ao longo deste trabalho.

Será ainda falado de uma técnica muito recente, a Harmony, e apesar de não ser invasiva constituiu um avanço tremendo na área do Diagnóstico pré-natal sendo assim digna de menção e exposição.

Resumidamente, a biopsia das vilosidades coriônicas está indicada para diagnóstico numa idade gestacional mais precoce. A amniocentese apresenta menor taxa de perda fetal comparada com esta técnica e é realizada mais tardiamente.

A amostra de sangue fetal poderá ser usada para auxílio a estas duas técnicas pois está associada a maiores taxas de complicações.

A fetoscopia esta reservada maioritariamente para terapêutica cirúrgica fetal no decorrer da gravidez para patologias que beneficiem de correcção urgente ou cujo *outcome* seja melhor do que se submetida apenas no timing do parto ou pós parto.

O *Harmony* apresenta alta taxa de diagnóstico e permite poupar assim a necessidade de submeter a grávida a exames invasivos desnecessários adicionais.

## ABSTRACT

The purpose of this literature review is to assess the current status of Fetal Maternal Medicine, the current invasive diagnostic techniques and embryo-fetal therapy that is being practiced.

The various techniques include chorionic villus biopsy, amniocentesis, fetal blood sample through different approaches (cordocentesis, liver puncture and cardiocentesis).

Whenever it's appropriated, the most relevant epidemiological studies will be referred to evaluate and support the indications, sensitivity and specificity of each technique, risks, complications and contraindications. The important comparison between each of the techniques will also be made.

We will also talk about fetoscopy. Being the latest of invasive techniques lacks epidemiological support. However, this allowed the medical revolution unimaginable until now: Surgical therapy in uterus during pregnancy . The various applications of the technique will also be discussed.

A very recent technique will also be mentioned, Harmony, and although not being invasive, it's been a tremendous advance in the Prenatal Diagnosis area being well worthy of mention and exposure.

In conclusion, chorionic villus is suitable for diagnosis in an early gestational age. Amniocentesis has lower rate of fetal loss compared with this technique and is done later.

A fetal blood sample can be used to aid the two techniques because it is associated with higher complication rates.

The fetoscopy is mostly reserved for fetal surgical therapy throughout pregnancy, in pathologies that benefit from urgent correction or whose outcome is better than if submitted only at the timing of delivery or postpartum.

Harmony has a high rate of diagnosis and spares the patient to undergo additional unnecessary invasive tests.

**Palavras-chave:**

Amniocentese

Amostra de sangue fetal

Biópsia Vilosidades Coriônicas

Diagnóstico pré-natal

Fetoscopia

*Harmony test*

Rastreo pré-natal

## ÍNDICE

Capa/Título.....	1
Resumo/ <i>Abstract</i> .....	2 e 3
Palavras Chave.....	4
Índice.....	5
Introdução.....	6
Objectivos.....	7
Desenvolvimento.....	7
Amniocentese.....	8
Biópsia das Vilosidades Coriônicas.....	13
Amostra de Sangue Fetal.....	18
Fetoscopia.....	22
Teste <i>Harmony</i> .....	25
Conclusão.....	28
Referências bibliográficas.....	30

## INTRODUÇÃO

O objectivo desta revisão bibliográfica é analisar as principais técnicas invasivas de diagnóstico e terapêutica embrio-fetal desde os detalhes técnicos, indicações e contra-indicações e sobrevivência dos fetos a curto e longo prazo após a realização de cada uma das técnicas. Sempre que pertinente será feita a menção aos estudos que comprovam as conclusões de maior interesse.

A amniocentese, biópsia das vilosidades coriônicas e amostra do sangue fetal são sustentados coadjuvantes de testes de screening, podendo inclusivamente serem técnicas terapêuticas em algumas situações que também serão abordadas. A amostra do sangue fetal pode ser obtida através do cordão umbilical, de uma punção intra-hepática e em último recurso de uma punção cardíaca.

Existe ainda uma outra técnica invasiva, a fetoscopia, que, sendo mais recente apresenta inúmeras opções de tratamento que não eram possíveis até então, desde o laser para laqueação selectiva de anastomoses, obtenção de biopsias, etc. Esta técnica começa a ser realizada no nosso país, tendo sido feita a primeira em meados de Dezembro de 2013 na maternidade Alfredo da Costa. Antes de se proceder à realização desta e de outras técnicas com potencial morbimortalidade associada devemos fornecer aconselhamento adequado à grávida acerca do objectivo do procedimento, precisão, potenciais complicações e limitações, tempo necessário para que os resultados estejam disponíveis e alternativas que possam fornecer a mesma ou informação semelhante. Estas questões naturalmente serão analisadas ao longo desta revisão. Ainda que fuja ligeiramente ao âmbito desta revisão bibliográfica, por ser um avanço tremendo na área do diagnóstico pré-natal, será ainda descrito o novo teste pré-natal disponível, *Harmony*.

## **OBJECTIVOS**

Rever as principais técnicas invasivas de diagnóstico pré-natal, as suas indicações, contra-indicações, riscos e complicações, comparando-as nas diferentes vertentes.

## **DESENVOLVIMENTO**

A medicina materno-fetal tem sofrido uma evolução tremenda nos últimos anos graças aos avanços científicos e tecnológicos que têm sido disponibilizados e disseminados pelos mais diversos centros médicos. Os avanços na área da Genética têm sido tremendos e de extrema importância, mas analisando em larga escala, são ainda reduzidos, sendo esta uma área com muito por descobrir. Até muito recentemente, o diagnóstico pré-natal era limitado, assim como as opções que poderiam ser discutidas tanto para o feto, como para a grávida. Estão a ser desenvolvidas técnicas de diagnóstico fetal cada vez mais seguras e eficazes, e a detecção precoce está a ampliar as opções terapêuticas.

O aborto deixou de ser uma das poucas opções possíveis, podendo oferecer actualmente novos tratamentos médicos e cirúrgicos intra-uterinos.

Vamos analisar de seguida as várias técnicas de diagnóstico pré-natal que estão disponíveis.

Importa referir a actual lei em vigor em Portugal para a prática do abortamento, uma vez que esta pode condicionar a opção da grávida e do profissional quanto à técnica a escolher.

Segundo o “Acórdão n.º 75/2010 e o artigo 142.º do Código Penal, com a redacção que lhe foi introduzida pelo Decreto -Lei n.º 48/95, de 15 de Março, e pela Lei n.º 90/97, de 30 de Julho”, o aborto é permitido nas seguintes situações: quando houver seguros motivos para prever que o nascituro virá a sofrer, de forma incurável, de grave doença ou malformação congénita, e for realizada nas primeiras 24 semanas de gravidez, excepcionando-se as situações de fetos inviáveis, caso em que a interrupção poderá ser praticada a todo o tempo; ou quando for realizada, por opção da mulher, nas primeiras 10 semanas de gravidez.

## **Amniocentese**

A amniocentese é uma técnica usada para obter líquido amniótico da cavidade uterina através de punção transabdominal. A amniocentese para estudos genéticos pré-natais é tecnicamente possível em qualquer idade gestacional, após cerca de 11 semanas de gestação, mas a sua realização está otimizada entre 15 a 17 semanas de gestação. Procedimentos realizados antes das 15 semanas estão associados com maior perda fetal (perfuração de membranas, devido à " fusão" fisiológica incompleta do âmnio, cório e decídua parietal) e outras complicações, incluindo falha na cultura celular, e deve ser evitada. Procedimentos mais tardios podem ser problemáticos para com as questões legais que abordamos anteriormente.

Uma vez obtido o líquido amniótico, poderão ser realizados testes laboratoriais uma vez que este fluido apresenta uma miríade de substâncias fetais: urina, secreções, células esfoliadas e transudado.

As indicações mais comuns de diagnóstico para a realização da amniocentese são os rastreios pré natais positivos e avaliação da maturidade pulmonar fetal. Outras indicações são a avaliação de possível infecção fetal, morte fetal, o grau de anemia hemolítica se presente, tipo sanguíneo ou forma plaquetar, hemoglobinopatias, e ainda o estudo de defeitos do tubo neural.

É comumente associada a uma técnica de diagnóstico, no entanto pode também ser utilizada como técnica terapêutica, não apenas na remoção do excesso de líquido amniótico (polihidrâmnios sintomático) mas também na introdução de líquido amniótico (amnioinfusão), quando o nível deste é inferior a 200ml, condição denominada por oligoâmnios. Pode também ser utilizada na síndrome de transfusão feto – fetal e em casos de prolapso dos tecidos fetais para facilitar a colocação de uma cerclage de emergência [1].

Acerca da necessidade de profilaxia antibiótica, ainda não existem estudos que suportem uma conclusão sólida acerca da sua eficácia e as actuais *guidelines* atribuem a indicação para não ser usada [2]. O grau que suporta esta evidência é 2C.

Para a escolha do local e monitorização do procedimento é utilizado a ultrasonografia que naturalmente aumenta a precisão do procedimento. A placenta deve ser evitada se possível (segundo alguns estudos, mas este tema é controverso).

A anestesia local é opcional mas geralmente desnecessária.

Nas mulheres *Rh* negativas para profilaxia da isoimunização *Rh* é administrada gamaglobulina anti D, durante a realização do procedimento. A *ACOG* (*american congress of obstetricians and gynecologists*) recomenda uma dose de 300 mcg.

A taxa de insucesso da técnica (não obtenção de líquido amniótico depois das 15 semanas por médicos experientes) ocorre em menos de 1 por cento dos pacientes [3, 4,5].

As complicações habituais englobam dores uterinas, *spotting* ocasional e perda vaginal de algumas gotas de líquido amniótico que podem ocorrer imediatamente após o procedimento. No entanto as grávidas devem ser instruídas acerca dos sinais de alerta clínico. O líquido amniótico volta ao seu valor normal dentro de uma média de três semanas [6].

A segurança da amniocentese tem sido abordada por vários estudos caso-controle. As principais complicações severas da amniocentese são: ruptura das membranas; lesão fetal directa; lesão fetal indirecta; infecção e perda fetal. As complicações maternas relacionadas ao procedimento, como amnionite, são raras, ocorrendo em menos de 1 em 1000 procedimentos. A separação corioamniótica pode ocorrer após a amniocentese. No entanto, isso não parece afectar o resultado da gravidez, a menos que se estenda por toda a superfície corioamniótica [7].

A ocorrência de lesão fetal directa decorrente da punção com a agulha é rara e inclui sangramento, ondulações da pele, lesões oculares e anomalias intracranianas e intestinais. Num estudo randomizado incluindo 2239 gestações não houve relato de lesão fetal directa [3].

No entanto podem ocorrer lesões fetais indirectas. Alguns estudos prospectivos relataram um aumento na taxa de malformações ortopédicas (pés deformados *equinovarus* ou luxação congénita da anca) e problemas respiratórios em crianças em comparação com os controles que não se submeteram a amniocentese. As frequências reais destes eventos variam entre 0,56 e 0,76 para problemas ortopédicos e entre 0,45 e 1,2 para o risco de SDR [3,8,9]. Outro estudo prospectivo concluiu que procedimentos invasivos no 1º trimestre estão associados com maior morbidade respiratória nos

recém-nascidos [10]. Pensa-se que o mecanismo subjacente a ambas as complicações seja a compressão fetal como consequência da diminuição do líquido amniótico.

A longo prazo, um estudo de coorte revelou que a realização da amniocentese não foi associada a um aumento significativo da taxa de grandes deficiências no acompanhamento (7 a 18 anos após o nascimento) [11].

A transmissão vertical de vírus pode ocorrer na hepatite B e C, citomegalovírus, toxoplasmose, e VIH. A taxa é naturalmente mais elevada quando as grávidas apresentam carga viral elevada/não efectuam tratamento antiretroviral.

Aquando da realização da amniocentese, se ocorrer perfuração intestinal e contaminação do líquido amniótico pode haver infecção intra-uterina, perda da gravidez e ainda choque séptico.

A taxa de falha de cultura de amniócitos é de apenas 0,1 por cento do total das amostras [12].

Um resultado possível nas amostras é o de mosaicismo. Importa esclarecer este conceito, que consiste numa ou mais linhas de células anormais, e uma linha de células normais, em pelo menos duas culturas primárias, a partir do mesmo indivíduo. Ocorre em 0,1 a 0,2 por cento das gravidezes submetidos a amniocentese [13]. Pseudomosaicismo (ou seja, uma linha de célula anormal confinado a um frasco de cultura) é mais comum, ocorrendo em até 8 por cento das gravidezes [13]. Se o mosaicismo for detectado na amniocentese este pode ser de origem materna e uma amostragem de sangue fetal poderá ser útil para confirmar ou excluir o mosaicismo fetal e auxiliar assim um correcto diagnóstico pré-natal.

A maior parte das perdas fetais/abortamentos ocorre até 4 semanas após a amniocentese e são condicionadas por uma variedade de factores que afectam o risco de perda fetal relacionada ao procedimento [3, 14, 15]. O mais importante é sem dúvida alguma a experiência do operador, e ainda que não seja possível aferi-la ou avalia-la por taxas, esta desempenha um papel crucial na taxa de perda fetal. Como qualquer técnica apresenta uma curva de aprendizagem. Os casos mais complexos exigem a experiência de um profissional mais treinado.

Há controvérsia acerca da relação do número de punções e aumento do risco de perda fetal mas vários estudos apontam para uma relação directa entre eles.

Sangramento vaginal, resultados anormais da triagem materna, história de abortamento (espontâneo ou induzido) são factores de risco adicionais para perdas fetais após amniocentese assim como a idade materna aumentada.

Um índice de massa corporal superior a 40 kg/m<sup>2</sup> está associado com um aumento significativo de perda fetal em comparação com um inferior a 25 kg/m<sup>2</sup> (OR ajustado de 2,2, 95% CI 1,2-3,9) [16].

Um dos dados mais importantes a nível epidemiológico, se não mesmo o mais importante quando falamos de uma técnica invasiva com potencial mortalidade associada é saber qual a taxa de perda atribuível dessa mesma técnica. Segundo os vários estudos, a taxa de perda fetal atribuível à amniocentese é cerca de 0,06 a 1,0 por cento (1/100 a 1/1000). A *ACOG* refere uma taxa de perda relacionada com o procedimento entre 1/300 a 1/500.

Uma das limitações dos estudos caso controlo e coorte é a subestimação da perda fetal pós-amniocentese devido ao término da gravidez quando o resultado é anormal.

Para evitar esta limitação o estudo *FASTER* seleccionou grávidas que tinham rastreio negativo nos 2 trimestres para serem submetidas a amniocentese. O excesso atribuível de perda fetal foi de 0,15 por cento (95% CI 0.25-0.81) com uma perda relacionada ao procedimento entre 1/600 a 1/700 procedimentos [14].

Outra limitação destes estudos é a perda de casos que deixaram de fazer *follow-up*.

A última limitação é que nem todos os estudos usaram ecografia para guiar a punção. Actualmente todos se baseiam no uso de eco.

Assim, estudos randomizados são idealmente posicionados para fornecer as melhores conclusões. No entanto, apenas um destes testes foi conduzido pelo que tem pouca força científica.

No caso de uma gravidez múltipla está indicada uma punção para cada cavidade amniótica. Apenas se usa uma punção única em gravidez gemelar monocoriónica. A injeção de um marcador após a punção de um saco amniótico garante que quando se punciona o outro saco amniótico não estamos a puncionar o anterior evitando assim

uma taxa errada de diagnóstico de 3,5 por cento das amostras quando o marcador não é injectado [17].

A taxa de perda de gémeos após realização de amniocentese está aumentada 1 por cento em relação à linha de base (aqueles não submetidos a esta técnica) [18,19].

## **Biópsia Vilosidades Coriônicas**

A biópsia das vilosidades coriônicas (BVC) é uma alternativa à amniocentese e consiste na obtenção de pequenas amostras da placenta para estudo de ADN e cromossómico. É geralmente feita durante o primeiro trimestre (após as 10semanas) reduzindo assim o período de ansiedade da grávida enquanto aguarda pelos resultados, permitindo assim uma interrupção da gravidez numa fase mais precoce e mais segura.

Comparando com a amniocentese, a BVC permite uma amostra de ADN superior, sendo assim possível análise fiável do ADN dentro de horas ou dias após a obtenção da amostra.

A obtenção do cariótipo pode ocorrer dentro de 48horas após a aquisição da amostra, mas também se aconselha a cultura celular (que pode demorar vários dias mas diminui o risco de falsos positivos [20]). Esta rapidez na obtenção de resultados é uma vantagem quando comparada à amniocentese.

A BVC é um procedimento feito em ambulatório, sem analgesia ou anestesia. Há duas abordagens possíveis, transcervical (TC) e transabdominal (TA).

Se optarmos pela TC devem ser feitas primeiramente culturas do exsudado cervico-vaginal para despistar os principais agentes patogénicos (gonorreia, *chlamydia*, *streptococcus* grupo B) e se positivos devem ser adequadamente tratados.

Descrevendo o procedimento, é inserida uma sonda metálica que guia a cânula transcervical que é colocada de seguida, sendo que as vilosidades coriônicas são aspiradas da placenta.

Quanto à abordagem transabdominal a técnica é semelhante à amniocentese.

A taxa de sucesso de amostragem na primeira tentativa é significativamente mais elevada com a TA do que com TC (98 contra 96 por cento) [21]. A taxa de sucesso de amostragem é de pelo menos, 99 por cento, após menos do que três inserções placentares e não difere consoante a abordagem.

A amostra de vilosidade pode então ser analisada nos diferentes meios disponíveis.

Para o caso de gestações múltiplas, é o número de corions vai determinar o número de amostras a obter.

As indicações são sensivelmente as mesmas da amniocentese, já faladas anteriormente.

A indicação mais comum é um resultado positivo no rastreio pré-natal, ou quando anomalias congénitas são detectadas na ecografia. Outras indicações são a idade materna avançada (aumento do risco de alterações cromossómicas tais como aneuploidias fetais), rastreio ou história familiar positiva de cromossomopatia.

Vamos abordar de seguida as contra-indicações às diferentes abordagens. A infecção ou estenose cervical, miomas cervicais ou do segmento uterino inferior (que obstruam o acesso ao fundo da placenta) são contra-indicações à abordagem transcervical, assim como a anteflexão ou retroversão uterina severa.

As únicas contra-indicações à transabdominal são raras e consistem na retroflexão uterina extrema com ansas intestinais entre a parede abdominal e o útero e posição fetal a obstruir o acesso à placenta posterior

A presença de DIU é uma contra-indicação relativa a ambas.

Tal como na amniocentese é aconselhado proceder à profilaxia da isoimunização *Rh*. A hemorragia feto-materna pode aumentar a resposta imune materna em mulheres que já estão sensibilizadas e levar rapidamente a uma grave eritroblastose fetal.

As complicações mais sérias da BVC são semelhantes às da amniocentese e incluem sangramento, infecção, dano ou perda fetal.

Uma meta-análise de estudos de coorte concluiu que taxa de perda de gravidez foi de 0,7 por cento no prazo de 14 dias de um procedimento TA CVS, de 1,3 por cento em 30 dias, e de 2 por cento para a perda a qualquer momento da gravidez [22].

Dado que a amniocentese e a BVC são realizadas em *timings* diferentes (a BVC é realizada em média 4 a 6 semanas antes), não podemos comparar a taxa de perda fetal espontânea para determinar o risco relacionado com o procedimento. É necessário avaliar a perda fetal total através de estudos randomizados.

Estes concluíram que há um aumento significativo no total de perdas fetais após BVC, e nos que compararam especificamente a BVC TC com amniocentese, observaram uma diferença média de perda fetal de 3,5 por cento superior para a TC [21,23,24,25]. Comparando especificamente TA CVS e amniocentese as taxas de perda fetal foram semelhantes (6,3 e 7,0 por cento respectivamente) [21].

Outros estudos acerca da taxa de perda fetal demonstraram uma diferença de 2,9 por cento comparando BVC e amniocentese, com excesso para a primeira [23].

A BVC é menos segura do que a amniocentese, e o excesso de risco parece estar confinado a TC CVS [21, 27, 28].

A taxa de mortalidade perinatal cumulativa não é significativamente diferente comparando BVC (independentemente da abordagem) e amniocentese [26].

Apenas um dos ensaios analisou a taxa de sobrevivência dos fetos: foi 4,6 por cento menor em mulheres submetidas a BVC em comparação com a amniocentese (86 contra 91 por cento) [23]. Esta diferença reflecte o maior número de perdas fetais espontâneas antes das 28 semanas, que podem ter sido relacionadas com o procedimento, e também reflecte o número superior de interrupções de gravidez devido às alterações cromossómicas que foram detectadas mais precocemente devido à BVC.

A data aquando da obtenção da amostra é o principal factor que altera as taxas de perda fetal.

A experiência do operador, tal como na amniocentese é crucial. Importa referir que a curva de aprendizagem da TA é mais rápida do que TC. Outros factores são o tamanho do feto na altura do procedimento (fetos pequenos para a idade gestacional têm uma taxa de perda mais elevada após a realização da técnica). O número de vezes que o dispositivo de amostragem tem de ser introduzido antes de obter tecido adequado afecta logicamente a taxa global de perda fetal, mas é impossível estabelecer uma ligação entre o número de punções e a sobrevivência fetal.

Comparando agora a sensibilidade da amniocentese e BVC, são ambas de 99,6 por cento (falso negativo de 0,4 por cento); a especificidade da amniocentese é de 99,93 por cento (0,07 por cento falso positivo) e a especificidade de BVC, 99,90 por cento (falsos positivos de 0,1 por cento) [26].

A idade gestacional a partir da qual a técnica deve ser realizada é a partir das 10 semanas. Um aumento da taxa de anormalidades de membros tem sido relatado quando a BVC é realizada em menos de nove semanas de gestação. Este risco parece ser maior quando a BVC é realizada durante a fase de desenvolvimento embrionário e diminui com o avançar da gestação, atingindo o plateau final às 11 semanas de gestação [29]. Assim, 10 semanas é o limite inferior geralmente aceite para realizar BVC. Em alguns

casos estas alterações estão associadas com hipogenesia oromandibular (o chamado síndrome hipogenesia oromandibular-membros).

A nível de complicações desta técnica, hemorragia significativa ocorre em menos de 6 por cento dos casos (e é mais comum após a abordagem TC); no entanto o *spoting* vaginal é comum, podendo manifestar-se em até 1/3 das grávidas [23, 26, 27].

Relatos de complicações infecciosas pós-procedimento são raros. O risco de infecção é maior na abordagem TC. A maior preocupação reside nas infecções subclínicas que podem ser a causa de uma parte do excesso de perdas fetais relatadas após TC do que com TA (uma vez que o quadro pode ser mais insidioso).

Existe também um risco de transmissão vertical da infecção materna quando presente semelhante ao da amniocentese, já falado anteriormente.

A hemorragia feto-materna ocorre numa percentagem substancial de casos e é denotada através de um aumento de alfa feto proteína (AFP) no soro materno. A abordagem TA está associada a um maior risco deste evento. Tem sido proposta como uma causa de perda fetal após BVC, particularmente quando o valor de AFP é muito elevado ou continua a aumentar depois da realização da técnica.

Acerca de complicações obstétricas, um grande estudo de coorte de base populacional, incluindo 1984 mulheres submetidas a BVC e 47 854 controles não expostos, descobriu que as taxas de complicações na gravidez (descolamento prematuro da placenta, placenta prévia, parto prematuro, hipotonia uterina) e taxas de parto vaginal ou abdominal operatório não foram significativamente maiores em mulheres submetidas a BVC [30].

Em contraste, um estudo finlandês que englobou 887.439 nascimentos, dos quais 3346 foram complicadas com um descolamento placentar e que este foi associado à BVC (OR 1,48, 95% CI 1,12-1,96) [31].

Vários estudos têm documentado que a BVC está associada a maior risco de pré-eclâmpsia subsequente.

Um inquérito por questionário de 1509 mulheres que foram submetidas a BVC TC não encontrou aumento nas taxas de malformações congénitas, morbidade neonatal, morbidade pediátrica exigindo internamento ou tratamento ambulatorio, perturbação

funcional e crescimento físico abaixo do percentil 10 associadas à realização da técnica [32].

Para confirmar estes dados, um estudo de coorte de base populacional de mulheres de 35 a 49 anos comparou a morbidade infantil de pessoas expostas à BVC versus aqueles não expostos. Também não foi encontrado aumento na mortalidade fetal e infantil, prematuridade, baixo peso ao nascer, ou defeitos de redução de membros em associação com BVC [33].

### **Amostra de Sangue Fetal:**

A amostra de sangue fetal, vulgarmente conhecida por cordocentese engloba as 3 técnicas usadas para obter acesso ao sangue fetal: punção do cordão umbilical, amostra de sangue intra-hepático e cardiocentese. Esta técnica também pode ser usada como terapêutica para a administração de fármacos ou outras substâncias para o feto.

É utilizada como auxílio ao diagnóstico de desordens fetais. Uma vez que apresenta alto risco de complicações fetais e existem outras alternativas com menor risco diagnóstico, a amniocentese, a biópsia das vilosidades coriônicas e ainda o sangue materno, esta deve ser limitada às situações em que as últimas não ofereçam adequada ou suficiente informação.

No entanto, a obtenção do sangue fetal tem uma grande vantagem em relação às técnicas mencionadas anteriormente: obtenção do cariótipo em 24 a 48 horas versus 7 a 10 dias quando amniócitos ou células das vilosidades coriônicas são cultivadas (precisam de ser estimuladas a crescer enquanto que as do sangue estão em divisão rápida).

Pode ser necessário administrar no feto um relaxante muscular (atracúrio) para garantir que este fica imóvel durante o procedimento. Os efeitos cardíacos nocivos para o feto são mínimos [34].

Tal como os outros procedimentos invasivos mencionados anteriormente, a amostra de sangue fetal deve ser guiada por eco.

Importa advertir que os fetos com alterações plaquetares devem ser transfundidos com concentrado plaquetar antes de se obter a amostra sob pena de hemorragia severa.

Vamos abordar de seguida os diferentes locais de amostragem.

Amostra de sangue do cordão umbilical (cordocentese) é a mais utilizada. Deve ser preterida a veia em relação a uma artéria. A punção da artéria está associada a maior bradicardia e maior sangramento pós procedimento [35, 36]. Como nos restantes procedimentos deve-se monitorizar a estabilidade fetal após a realização do mesmo.

Uma veia intra-hepática é outra das hipóteses para obtenção de sangue fetal. É inserida uma agulha através do abdómen fetal que vai puncionar a porção intra-hepática da veia umbilical ou da veia porta esquerda.

Esta abordagem apresenta várias vantagens em relação à cordocentese. A ausência de necessidade imediata de confirmação laboratorial para garantir a origem da amostra (certeza de proveniência venosa do sangue), e a menor ocorrência de hemorragia feto-materna, e por conseguinte menor risco de aloimunização porque se evita a placenta, constituem duas vantagens.

Outra vantagem é o muito menor sangramento comparado com a cordocentese (0,8 vs 30 por cento) [37], assim como o fácil acesso ao local de amostra em casos de placenta posterior ou gémeos. O risco desprezível de hemorragia comparado à cordocentese demonstra ser uma grande vantagem em casos com risco de trombocitopenia fetal.

Esta abordagem pode ser usada como segunda linha quando a cordocentese falha, mas começa já a ser usado em alguns centros como procedimento de primeira linha. O procedimento é seguro, dado que não há alterações nas concentrações enzimáticas após a realização da técnica (o que demonstra que a lesão hepática é mínima).

A última abordagem possível é a cardiocentese. Esta apresenta poucas indicações devido a alta taxa de perda fetal (5,6 por cento) [38]. Está reservada a casos onde há uma alta probabilidade de uma grande alteração fetal e a punção aos outros locais é tecnicamente impossível ou falhou repetidamente.

Falaremos de seguida das complicações desta técnica. Estas incluem hemorragia, bradicardia, infecção. As complicações maternas não relacionadas com a gravidez são raras.

O hematoma do cordão umbilical, uma complicação possível, é geralmente assintomático mas pode estar associado com bradicardia transitória ou prolongada. Se o mau estado fetal persistir está indicada a realização do parto. Não há relação entre o tamanho do hematoma e a duração de bradicardia fetal ou sangramento do local de punção.

A hemorragia feto-materna ocorre normalmente em 40 por cento dos casos [39, 40, 41]. Pode-se definir pelo aumento superior a 50 por cento de alfa feto proteína no soro materno (antes e após procedimento).

A bradicardia fetal está relatada em 5 a 10 por cento dos fetos [42]. A maior parte dos casos resolve espontaneamente dentro de 5 minutos. A maior incidência de bradicardia após punção arterial sugere que esta seja devida a resposta vasovagal induzida pelo vasospasmo. Esta também é mais frequente em fetos com restrição de crescimento.

O risco de infecção fetal é mínimo e restringe-se essencialmente à corioamnionite. A infecção ocorre em menos de 1 por cento dos procedimentos mas é responsável por 40 por cento das perdas fetais [43, 44]. Como tal é feita profilaxia antibiótica, ainda que o benefício desta intervenção continue por provar. Dado que este é um procedimento limpo com baixo risco de infecção, muitos centros optam por não realizar profilaxia antibiótica. Os que optam por fazer administram antibiótico 30 a 60 minutos antes do procedimento.

A taxa de falha técnica na cordocentese é de 9 por cento e da veia hepática é de 5 por cento [45].

Acerca da perda fetal, a relação entre o procedimento e *outcome* fetal a longo prazo é difícil de avaliar porque não é feito o *follow-up* de muitos casos. Uma revisão dos casos publicados demonstrou um risco total de abortamento/perda fetal de 1,4 por cento antes das 28 semanas e um risco adicional de 1,4 por cento de morte perinatal após as 28 semanas [46]. Esta taxa de perda é substancialmente superior à da amniocentese (0,5 a 1 por cento) e cerca de 6 vezes superior à da população obstétrica geral com um parto de termo.

Outro estudo caso-controlo de larga escala comparou o *outcome* de 1020 mulheres que foram submetidas a cordocentese entre as 16 e 24 semanas. As taxas de perda antes das 28 semanas nos casos e controlo foram de 1,8 e 0,7 por cento (respectivamente) e de 1,5 e 1,1 por cento depois das 28 semanas [47].

Vamos abordar de seguida os principais factores de risco para perda fetal. A indicação para o procedimento é um dos factores de risco. O risco de perda fetal é maior quando existem anormalidades fetais.

A taxa de perda espontânea é de 1 por cento quando a técnica é feita num feto aparentemente normal para despiste de alterações genéticas ou de cariótipo; 7 a 13 por cento quando na presença de alterações estruturais; 9 a 14 por cento em fetos com restrição de crescimento; 25 por cento em fetos com *hidropsis* fetal não imune [48,49].

A experiência do operador é também fulcral, tal como nas outras técnicas.

Por fim, a penetração placentar [50] e idade gestacional inferior a 24semanas [51] também constituem factores de risco acrescidos para perda fetal.

O risco de transmissão vertical existe e está relacionado com a carga viral da grávida. Se possível esta deve ser adequadamente tratada para reduzir a carga viral para valores mais baixos antes de se realizar a técnica.

No caso de gravidezes múltiplas o acesso ao local da amostra pode ser mais difícil e a incidência de complicações é naturalmente maior.

## **Fetoscopia**

Uma outra técnica de diagnóstico e terapêutica embrio-fetal é a fetoscopia. Esta é a mais recente das técnicas abordadas até esta altura nesta revisão bibliográfica.

A fetoscopia permite não apenas a visualização do feto, mas também intervenções terapêuticas (laser de vasos anormais por exemplo) ou realização de biopsia de vários tecidos.

É realizada quando a placenta já está suficientemente desenvolvida para permitir um diagnóstico de possíveis anomalias no crescimento do feto. Este facto determina necessariamente que a fetoscopia seja realizada a partir da 18ª semana de gestação.

Existem 2 tipos de fetoscopia: externa e endoscópica.

A externa é realizada com um instrumento semelhante a um estetoscópio. É usada para ouvir os sons cardíacos fetais. Também permite a monitorização fetal, por exemplo durante o trabalho de parto sem que a mãe tenha que estar ligada a um monitor fetal.

O segundo tipo de fetoscopia é através de um endoscópio de fibra óptica que pode estar acoplado a um fibrolaser. É inserido por via TA ou TC para visualizar o feto, obter amostras de tecido fetal ou para realizar cirurgia fetal intra-uterina.

Vamos listar e aprofundar de seguida algumas das anomalias fetais que podem ser tratadas por fetoscopia, por via endoscópica.

A hérnia diafragmática congénita é uma das indicações para correcção cirúrgica por fetoscopia. Através da hérnia os órgãos abdominais podem protudir na cavidade torácica e causar hiperplasia pulmonar (pulmões subdesenvolvidos). Esta ocorre em 1/2000 partos [52].

Outra indicação cirúrgica é a presença de um teratoma sacrococcígeo, um tumor geralmente benigno, que pode surgir na região sacral do feto e que na maioria das vezes, é operado apenas após o nascimento. Nalguns casos, pode mesmo apresentar um crescimento muito rápido e volumoso, e, subseqüentemente sobrecarregar o coração do feto. A fetoscopia, através a utilização de fibrolaser, pode coagular os vasos do tumor, reduzindo a sua velocidade de crescimento e poupando assim o coração de risco de insuficiência cardíaca.

A brida amniótica tem uma incidência estimada em cerca de 1 em 1200 a 1 em 15000 nados vivos [53]. Ocorre quando a membrana que reveste o líquido amniótico, membrana amniótica, se rompe na fase inicial da gestação, aderindo e estrangulando desde o extremo de um membro ou mesmo uma parte maior do feto. Isso pode levar a deformações e malformações. No limite, diminuindo a circulação sanguínea a um nível crítico, a amputação pode ser a única opção terapêutica uma vez que pode haver necrose tecidual irreversível. A única alternativa possível é cortar atempadamente a membrana responsável pela constrição através da fetoscopia.

A obstrução do trato urinário é outra indicação para a técnica. A uretra pode ficar obstruída ou falhar o seu desenvolvimento normal. Pode ocorrer dilatação vesical e hidronefrose. Subsequentemente há diminuição do líquido amniótico (é maioritariamente composto por urina fetal), e hipoplasia pulmonar também pode ocorrer, pois o seu adequado desenvolvimento depende do líquido amniótico.

A síndrome de transfusão feto fetal ou *twin-to-twin transfusion syndrome* é outra das indicações para a utilização da fetoscopia. A sua incidência é de entre 1 a 3 em cada 10 000 nascimentos [54]. No entanto é mais frequente nas gravidezes gemelares, ocorrendo em cerca de 15 por cento das gravidezes gemelares monocoriônicas (partilha da placenta). Há uma distribuição de volume sanguíneo desigual entre os 2 fetos, tendo um deles um volume de sangue baixo (feto dador) e o outro um volume de sangue extremamente alto [54]. Normalmente os fetos apresentam uma diferença de tamanho considerável entre eles, e 70-80% dos fetos morrem se não forem submetidos a uma intervenção.

Os tratamentos disponíveis para esta síndrome incluem a redução de líquido amniótico, septostomia (perfuração de membranas que separam os gémeos), e ablação laser das anastomoses placentares [55]. Se estas técnicas não tiverem sucesso pode-se optar pelo feticídio selectivo do feto que apresenta menor probabilidade de sobreviver.

No caso de um dos gémeos ser acardíaco também pode haver indicação para fetoscopia. Esta condição também ocorre em gravidezes monocoriônicas e caracteriza-se por um dos gémeos se desenvolver normalmente e o outro sem coração. Este recebe suporte sanguíneo do gémeo saudável cujo coração tem de trabalhar mais arduamente para bombear sangue para ambos os fetos. Aproximadamente 50 a 75 por cento dos gémeos acardíacos morrem como resultado. Esta ocorre em 1 por cento das gravidezes

monocoriónicas e em cada 1 em 35mil gravidezes [54].

Foi precisamente esta a primeira cirurgia fetal realizada em Portugal, na Maternidade Alfredo da Costa em Dezembro de 2013, ao laquear, no útero, os vasos sanguíneos que estavam a conduzir o sangue para o feto sem coração, e, a comprometer a vida do outro feto com 25 semanas de gestação, que corria o risco de entrar em insuficiência cardíaca e morrer. Esta técnica também recorreu a uma agulha com um fibrolaser acoplado. Com esta intervenção no útero, o feto sem coração vai agora ser reabsorvido pelo organismo. A cirurgia foi um sucesso e a grávida teve boa recuperação após a cirurgia.

A técnica também pode ser usada para obter sangue do cordão umbilical e amostras de pele fetal.

Dado que é uma técnica recente e utilizada em poucos centros médico-cirúrgicos (tal como vimos em Portugal a 1ª cirurgia a recorrer a esta técnica foi há poucos meses), os dados demográficos são ainda restritos.

Tal como nos outros procedimentos invasivos pode haver hemorragia, perda de líquido amniótico, infecção e hemorragia feto-materna. Pode haver ruptura prematura de membranas e ainda abortamento, porém, como referi estes dados ainda não está quantificado por estudos quantitativos populacionais.

O único dado aferido até então é a taxa de abortamento associada à fetoscopia: é de 3 a 5 por cento, e pode mesmo chegar até 12 por cento segundo alguns estudos, o que é uma taxa alarmante para um procedimento médico-cirúrgico [55].

Assim, o procedimento só está recomendado para os casos mais severos de alterações fetais que são passíveis de ser tratados durante a gravidez.

## **Teste *Harmony***

De seguida vamos abordar a mais recente novidade nos testes de rastreio não invasivos, que constitui uma nova arma diagnóstica e que certamente diminuirá a necessidade de recorrer aos testes invasivos que falamos anteriormente. Como vimos, estes estão sempre associados a morbi-mortalidade que nem sempre é desprezível. Para uma compreensão detalhada do que se trata o rastreio pré-natal será feita de seguida uma pequena revisão dos actuais testes de rastreio disponíveis.

O rastreio do primeiro trimestre é realizado entre as 10 e as 13 semanas (de preferência às 11 semanas). Nesta idade gestacional há 3 possibilidades: rastreio baseado exclusivamente nos achados ecográficos (TN, ossos do nariz) e idade materna; rastreio baseado apenas nos valores dos marcadores analíticos (sangue materno) e idade materna; ou rastreio usando todos os elementos possíveis (TN e, se possível, ossos do nariz + marcadores + idade materna), o que constitui um teste mais rigoroso. Caso se incluam neste rastreio os valores dos marcadores, deverá ser feita uma colheita de sangue para medir a concentração de PAPP-A e  $\beta$ -hCG. Contudo, o rastreio do 1º trimestre não se aplica aos defeitos do tubo neural.

O rastreio do segundo trimestre pode ser realizado entre as 14 e as 22 semanas (de preferência às 15 semanas). É feito o doseamento de AFP,  $\beta$ -hCG, uE3 e inibina-A, entre outras.

O rastreio integrado tem uma eficácia equivalente ao rastreio do 2º trimestre no que diz respeito aos defeitos do tubo neural e é o método existente mais sensível e rigoroso para o rastreio pré-natal de cromossomopatias.

O rastreio integrado faz-se em 2 fases. A primeira é realizada entre as 10 e as 13 semanas de gestação (de preferência às 11) e a segunda entre as 14 e as 22 semanas (de preferência às 15). A primeira fase envolve os seguintes passos: Ecografia para determinar com precisão o tempo de gestação e, se possível, para medir a translucência da face e do nariz; colheita de sangue para medir a concentração de PAPP-A; marcação da data para a segunda colheita de sangue (2ª fase) para medir os níveis de AFP,  $\beta$ -hCG livre, uE3 e inibina-A.

O rastreio integrado é gratuito no Serviço Nacional de Saúde e/ou participado pelas seguradoras, mas só se realiza entre as 11 e as 14 semanas de gestação e contam com uma taxa de 5 por cento de resultados falsos positivos.

Um novo método de rastreio (não invasivo) para a grávida surgiu recentemente. O *Harmony Test* é um teste sanguíneo pré-natal simples que analisa diretamente fragmentos de ADN livre específicos dos cromossomas das células fetais libertados no sangue materno para detetar trissomias fetais mais comuns (cromossoma 21, 18 e 13). O ADN livre refere-se a fragmentos de ADN que circulam no sangue periférico e que são libertados pelo feto durante a renovação celular [56].

Para tal basta proceder apenas a uma colheita de sangue da grávida. Como se trata de um exame em que o material sujeito a diagnóstico é uma amostra de sangue materno, facilmente compreendemos que os riscos associados a esta técnica são mínimos ou nulos e resumem-se aos cuidados associados a uma colheita sanguínea. Naturalmente que as únicas complicações podem ser as decorrentes da punção venosa, não tendo qualquer malefício para o feto que se encontra em crescimento.

Juntamente com esta segurança, os resultados do teste são de fácil interpretação: alto ou baixo risco (99,5 por cento dos valores são apresentados no *cutoff* de risco para as principais trissomias (menor que 1 em 10000 ou maior que 99 por cento). O elevado peso materno aumentado e idade gestacional precoce podem contribuir para diminuição do DNA fetal livre circulante [56].

Também permite saber o sexo fetal com taxa superior a 99 por cento de certeza. O *Harmony* pode ser realizado desde as 10 semanas de gestação. Está disponível para gestações unifetais ou gemelares, incluindo gestações de dadores de óvulos e concepções por fertilização in-vitro. Como limitações, este teste não avalia risco de mosaïcismo, trissomias parciais ou translocações.

O resultado está disponível dentro de 10 a 15 dias. Tem uma taxa de 0,1 por cento de falsos positivos. Foi estudado em mais de 8000 pacientes e os resultados são comprovados por vários estudos [57-63]. Comparado com o rastreio integrado, é mais

sensível e específico, o que reduz a necessidade de submeter a exames invasivos adicionais desnecessários.

Por enquanto, o único ponto menos positivo é o seu preço elevado (670€ em Portugal) não sendo participado pelo Serviço Nacional Saúde, nem pelas seguradoras.

Como tal, o *Harmony* está recomendado apenas a mulheres com factores de alto risco, segundo os estudos publicados em 2012 e 2013. O ideal é realizar o rastreio integrado e se este for positivo, então pode fazer-se o *Harmony*. Se este apresentar também um resultado positivo, deverá avançar-se para a realização de um teste invasivo (idealmente a BVC dada a data em que o *Harmony* é realizado).

## CONCLUSÃO

Vamos resumir de seguida as principais ideias a reter desta revisão bibliográfica e os principais dados acerca das várias técnicas de diagnóstico pré-natal e terapêutica embrio-fetal.

A amniocentese é a técnica de diagnóstico associada com o menor risco de perda fetal. Deve ser realizada entre as 15 e as 17 semanas de gestação. A verdadeira taxa de abortamento/perda fetal associada a amniocentese é incerta mas foram documentadas taxas que variam entre 1 /100 a 1/1000 segundo os vários estudos. Os riscos de lesão fetal directa ou lesão materna durante a amniocentese são mínimos, havendo apenas um pequeno risco de lesão fetal indirecta, como anormalidades ortopédicas e problemas respiratórios. A BVC é uma alternativa à amniocentese e um dos procedimentos de escolha para o diagnóstico pré-natal de doenças genéticas primeiro trimestre. A técnica apresenta um risco ligeiramente superior de perda fetal em comparação com a amniocentese.

A abordagem TA é preferível à TC. Os vários estudos indicam uma taxa de abortamento/perda fetal associada à técnica de 2 por cento. Podem surgir defeitos nos membros induzidos pelo procedimento mas estes são infrequentes quando a técnica é realizada após 10 semanas de gestação. A amostra de sangue fetal usa qualquer uma das três técnicas para obter acesso a sangue fetal: cordocentese, colheita de sangue intra-hepática, e cardiocentese. A amostragem fetal através da veia intra-hepática é geralmente reservada para os casos em que cordocentese falha ou não pode ser realizada. A cardiocentese tem uma alta taxa de perda fetal e é usada quando não há outras opções. A hemorragia fetal, bradicardia e infecção são as principais complicações sendo que complicações maternas são raras. Uma vez que apresenta altas taxas de complicações feto-maternas associadas, por norma a sua utilização está reservada para auxílio ao diagnóstico à amniocentese e biópsia das vilosidades coriónicas. A fetoscopia é uma técnica recente e apresenta inúmeras opções terapêuticas inimagináveis até então. Correção de hérnia diafragmática, bridas amnióticas, obstruções do trato urinário e

síndrome de transfusão feto-fetal são algumas das múltiplas aplicações do procedimento. Também pode ser usada para obtenção de biopsias fetais. Ainda não existem muitos estudos demográficos relacionados com a técnica mas os existentes permitiram inferir que a taxa de abortamento associada ao procedimento é de cerca de 3 a 5 por cento podendo chegar a 12 por cento segundo alguns estudos. O *Harmony*, ainda que sendo um teste não invasivo e fugindo assim ligeiramente ao âmbito desta revisão bibliográfica, é um avanço tremendo na área do diagnóstico pré-natal pelo que é digno de menção. É um teste sanguíneo materno pré-natal simples que detecta as trissomias fetais mais comuns (cromossoma 21, 18 e 13) com a incrível taxa de 0,1 por cento de falsos positivos. É realizado às 10 semanas, tem fácil interpretação e permite ainda aferir o sexo da criança. Por fim, importa referir que, independentemente da técnica, a escolha da mesma e as opções disponíveis tanto para a grávida como para o feto, não devem apenas seguir as indicações ou as mais recentes *guidelines* para essa mesma patologia ou situação. Cada caso deve ser alvo de uma abordagem multidisciplinar, ponderada e individualizada para que o melhor *outcome* materno-fetal seja garantido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Locatelli A, Vergani P, Bellini P, et al. (1999) Amnioreduction in emergency cerclage with prolapsed membranes: comparison of two methods for reducing the membranes. *Am J Perinatol* 16:73
- 2- Gramellini D, Fieni S, Casilla G, et al. (2007) Mid-trimester amniocentesis and antibiotic prophylaxis. *Prenat Diagn*; 27:956
- 3- Tabor A, Philip J, Madsen M, et al. (1986) Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. *Lancet*; 1:1287
- 4- Kalogiannidis I, Prapa S, Dagklis T, et al. (2011) Amniocentesis-related adverse outcomes according to placental location and risk factors for fetal loss after midtrimester amniocentesis. *Clin Exp Obstet Gynecol*; 38:239
- 5- Antsaklis A, Papantoniou N, Xygakis A, et al. (2000) Genetic amniocentesis in women 20-34 years old: associated risks. *Prenat Diagn*; 20:247.
- 6- Borgida AF, Mills AA, Feldman DM, et al. (2000) Outcome of pregnancies complicated by ruptured membranes after genetic amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol*; 183:937.
- 7- Levine D, Callen PW, Pender SG, et al. (1998) Chorioamniotic separation after second-trimester genetic amniocentesis: importance and frequency. *Radiology*; 209:175.
- 8- Sant-Cassia LJ, MacPherson MB, Tyack AJ. (1984) Midtrimester amniocentesis: is it safe? A single centre controlled prospective study of 517 consecutive amniocenteses. *Br J Obstet Gynaecol*; 91:736.
- 9- Cederholm M, Haglund B, Axelsson O. (2005) Infant morbidity following amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal karyotyping. *BJOG*; 112:394.
- 10- Greenough A, Naik S, Yuksel B, Thompson PJ, Nicolaides KH (1997) First trimester invasive procedures and congenital abnormalities. *Acta Paediatr*;86:1220-3
- 11- Baird PA, Yee IM, Sadovnick AD. (1994) Population-based study of long-term outcomes after amniocentesis. *Lancet*; 344:1134.
- 12- American College of Obstetricians and Gynecologists. (2007) Invasive prenatal testing for aneuploidy. *ACOG Practice Bulletin No. 88*, December 2007. *Obstet Gynecol*; 110:1459.
- 13- Hsu LY, Kaffe S, Jenkins EC, et al. (1992) Proposed guidelines for diagnosis of chromosome mosaicism in amniocytes based on data derived from chromosome mosaicism and pseudomosaicism studies. *Prenat Diagn*; 12:555.
- 14- Eddleman KA, Malone FD, Sullivan L, et al. (2006) Pregnancy loss rates after midtrimester amniocentesis. *Obstet Gynecol*; 108:1067.
- 15- Mazza V, Pati M, Bertucci E, et al. (2007) Age-specific risk of fetal loss post second trimester amniocentesis: analysis of 5043 cases. *Prenat Diagn*; 27:180.
- 16- Harper LM, Cahill AG, Smith K, et al. (2012) Effect of maternal obesity on the risk of fetal loss after amniocentesis and chorionic villus sampling. *Obstet Gynecol*; 119:745.
- 17- Weisz B, Rodeck CH. (2005) Invasive diagnostic procedures in twin pregnancies. *Prenat Diagn*; 25:751.
- 18- Vink J, Fuchs K, D'Alton ME. (2012) Amniocentesis in twin pregnancies: a systematic review of the literature. *Prenat Diagn*; 32:409.

- 19- Agarwal K, Alfirevic Z. (2012) Pregnancy loss after chorionic villus sampling and genetic amniocentesis in twin pregnancies: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 40:128.
- 20- Van den Berg C, Van Opstal D, Brandenburg H, et al. (2000) Accuracy of abnormal karyotypes after the analysis of both short- and long-term culture of chorionic villi. *Prenat Diagn*; 20:956.
- 21- Smidt-Jensen S, Permin M, Philip J, et al. (1992) Randomised comparison of amniocentesis and transabdominal and transcervical chorionic villus sampling. *Lancet*; 340:1237.
- 22- Mujezinovic F, Alfirevic Z. (2007) Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol*; 110:687.
- 23- Medical Research Council European trial of chorion villus sampling. (1991) MRC working party on the evaluation of chorion villus sampling. *Lancet*; 337:1491.
- 24- Lippman A, Tomkins DJ, Shime J, Hamerton JL. (1992) Canadian multicentre randomized clinical trial of chorion villus sampling and amniocentesis. Final report. *Prenat Diagn*; 12:385.
- 25- Borrell A, Fortuny A, Lazaro L, et al. (1999) First-trimester transcervical chorionic villus sampling by biopsy forceps versus mid-trimester amniocentesis: a randomized controlled trial project. *Prenat Diagn*; 19:1138.
- 26- Alfirevic Z, Sundberg K, Brigham S. (2003) Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev*; CD003252.
- 27- Jackson LG, Zachary JM, Fowler SE, et al. (1992) 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*; 327:594.
- 28- Brambati B, Terzian E, Tognoni G. (1991) Randomized clinical trial of transabdominal versus transcervical chorionic villus sampling methods. *Prenat Diagn*; 11:285.
- 29- Firth H. (1997) Chorion villus sampling and limb deficiency--cause or coincidence? *Prenat Diagn*; 17:1313.
- 30- Cederholm M, Haglund B, Axelsson O. (2003) Maternal complications following amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal karyotyping. *BJOG*; 110:392.
- 31- Minna T, Mika G, Tiina L, et al. (2011) Risk for placental abruption following amniocentesis and chorionic villus sampling. *Prenat Diagn*; 31:410.
- 32- Schaap AH, van der Pol HG, Boer K, et al. (2002) Long-term follow-up of infants after transcervical chorionic villus sampling and after amniocentesis to compare congenital abnormalities and health status. *Prenat Diagn*; 22:598.
- 33- Cederholm M, Haglund B, Axelsson O. (2005) Infant morbidity following amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal karyotyping. *BJOG*; 112:394.
- 34- Mouw RJ, Klumper F, Hermans J, et al. (1999) Effect of atracurium or pancuronium on the anemic fetus during and directly after intravascular intrauterine transfusion. A double blind randomized study. *Acta Obstet Gynecol Scand*; 78:763.
- 35- Weiner CP. (1987) Cordocentesis for diagnostic indications: two years' experience. *Obstet Gynecol*; 70:664.

- 36- Weiner CP, Wenstrom KD, Sipes SL, Williamson RA. (1991) Risk factors for cordocentesis and fetal intravascular transfusion. *Am J Obstet Gynecol*; 165:1020.
- 37- Aina-Mumuney AJ, Holcroft CJ, Blakemore KJ, et al. (2008) Intrahepatic vein for fetal blood sampling: one center's experience. *Am J Obstet Gynecol*; 198:387.e1.
- 38- Antsaklis AI, Papantoniou NE, Mesogitis SA, et al. (1992) Cardiocentesis: an alternative method of fetal blood sampling for the prenatal diagnosis of hemoglobinopathies. *Obstet Gynecol*; 79:630.
- 39- Nicolini U, Kochenour NK, Greco P, et al. (1988) Consequences of fetomaternal haemorrhage after intrauterine transfusion. *BMJ*; 297:1379.
- 40- Weiner C, Grant S, Hudson J, et al. (1989) Effect of diagnostic and therapeutic cordocentesis on maternal serum alpha-fetoprotein concentration. *Am J Obstet Gynecol*; 161:706.
- 41- Chitrit Y, Caubel P, Lusina D, et al. (1998) Detection and measurement of fetomaternal hemorrhage following diagnostic cordocentesis. *Fetal Diagn Ther*; 13:253.
- 42- Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM), Berry SM, Stone J, et al. (2013) Fetal blood sampling. *Am J Obstet Gynecol*; 209:170.
- 43- Weiner CP, Wenstrom KD, Sipes SL, Williamson RA. (1991) Risk factors for cordocentesis and fetal intravascular transfusion. *Am J Obstet Gynecol*; 165:1020.
- 44- Ludomirsky A, Weiner S, Ashmead GG, et al. (1988) Percutaneous fetal umbilical blood sampling: procedure safety and normal fetal hematologic indices. *Am J Perinatol*; 5:264.
- 45- Aina-Mumuney AJ, Holcroft CJ, Blakemore KJ, et al. (2008) Intrahepatic vein for fetal blood sampling: one center's experience. *Am J Obstet Gynecol*; 198:387.e1.
- 46- Ghidini A, Sepulveda W, Lockwood CJ, Romero R. (1993) Complications of fetal blood sampling. *Am J Obstet Gynecol*; 168:1339.
- 47- Tongsong T, Wanapirak C, Kunavikaturkul C, et al. (2001) Fetal loss rate associated with cordocentesis at midgestation. *Am J Obstet Gynecol*; 184:719.
- 48- Maxwell DJ, Johnson P, Hurley P, et al. (1991) Fetal blood sampling and pregnancy loss in relation to indication. *Br J Obstet Gynaecol*; 98:892.
- 49- Antsaklis A, Daskalakis G, Papantoniou N, Michalas S. (1998) Fetal blood sampling--indication-related losses. *Prenat Diagn*; 18:934.
- 50- Boupajit K, Wanapirak C, Piyamongkol W, et al. (2012) Effect of placenta penetration during cordocentesis at mid-pregnancy on fetal outcomes. *Prenat Diagn*; 32:83.
- 51- Liao C, Wei J, Li Q, et al. (2006) Efficacy and safety of cordocentesis for prenatal diagnosis. *Int J Gynaecol Obstet*; 93:13.
- 52- Creasy, Robert K., and Robert Resnik. (1999) *Maternal-Fetal Medicine*, 4th Edition. Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- 53- Scott, James R. et al. (1999) *Danforth's Obstetrics and Gynecology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkens.
- 54- Blickstein I. (2006) Monochorionicity in perspective. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 27:235–238
- 55- Gratacos, E. and J. A. Deprest. (2000) Current Experience With Fetoscopy and the Eurofoetus Registry for Fetoscopic Procedures. *European Journal of*

- Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology 92, no. 1 (September): 151–159
- 56- Gil MD, et al. (2013) Fetal Diagn Ther., Nov 15
- 57- Sparks, A.B., Wang, E.T., Struble, C.A., Barrett, W., et al, (2012) Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. Prenat Diagn, Jan;32(1):3-9.
- 58- Sparks, A.B., Struble, C.A., Wang, E.T., Song, K., Oliphant, A. (2012) Non-invasive Prenatal Detection and Selective Analysis of Cell-free DNA Obtained from Maternal Blood: Evaluation for Trisomy 21 and Trisomy 18, Am J Obstet Gynecol., Apr;206(4):319.e1-9.
- 59- Ashoor, G., Syngelaki, A., Wagner, M., Birdir, C., Nicolaides, K.H. (2012) Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18, Am J Obstet Gynecol., 31(4):237-43. Epub 2012 May 4.
- 60- Ashoor, G., Poon L. Syngelaki, A., Mosimann B, Nicolaides, K.H., (2012) Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: effect of maternal and fetal factors, Fetal Diagn Ther. ;31(4):237-43. Epub 2012 May 4.
- 61- Norton, M., Brar, H., Weiss, J., Karimi, A., et al. (2012) Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: Results of a Multicenter, Prospective, Cohort Study for Detection of Fetal Trisomy 21 and Trisomy 18, Am J Obstet Gynecol., Aug;207(2):137.e1-8.
- 62- Brar H, Wang E, Struble C, et al. (2012) The fetal fraction of cell-free DNA in maternal plasma is not affected by a priori risk of fetal trisomy. J Matern Fetal Neonatal Med., Jan;26(2):143-5.
- 63- Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G, et al. (2012) Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. Am J Obstet Gynecol., 207:374.e1-6.