

## Cariotipo de células fetales en el diagnóstico prenatal en Costa Rica

Isabel Castro Volio<sup>1</sup>, Gerardo Escalante López<sup>2</sup>, Haroldo Mora Palma<sup>2</sup>, Dania Guerra Carles<sup>2</sup>, Luis Sánchez Chaves<sup>2</sup> y Carlos Peña Obando<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

<sup>2</sup> Unidad de Perinatología, Servicio de Obstetricia, Hospital Rafael Angel Calderón Guardia, Caja Costarricense de Seguro Social (C.C.S.S.), San José, Costa Rica.

<sup>3</sup> Servicio de Neonatología, Hospital Rafael Angel Calderón Guardia, C.C.S.S., San José, Costa Rica.

(Revisado 20-X-1994. Aceptado 17-XI-1994)

**Abstract:** The results of 182 genetic amniocenteses between 14 and 37 weeks gestation, from 1986 to 1992, and of two cordocenteses in 1992, are reported. There were two main reasons for referral: maternal age 35 years and older and abnormal ultrasound assessment. Fetal cells were closed cultured and mass harvested. In 3.7% of cases fetal chromosomes were defective. Turn around time was about three weeks up to and including 1991 and two weeks in 1992, culture failure rate was 7% that year. No cytogenetic misdiagnosis and no complication or sequelae related to the amniocenteses were detected. We conclude this is a safe and reliable procedure to obtain fetal karyotypes and to improve obstetric management of high-risk pregnancies.

**Key words:** Amniocenteses, prenatal diagnosis, fetal chromosomes, karyotype, pregnancy.

El desarrollo de la citogenética humana ha sido vertiginoso en los últimos años, particularmente en lo que a técnicas diagnósticas se refiere (Summers y Clarke 1988). Por el contrario, el avance en el tratamiento de la patología cromosómica ha sido muy pobre, se limita a algunos esfuerzos para prevenir complicaciones y minimizar el daño ocasionado por estos defectos. Ni siquiera la naciente terapia génica ofrece perspectivas de solución, puesto que las cromosopatías involucran a gran cantidad de genes, la mayoría de los cuales aún no han sido siquiera mapeados (Morgan y Anderson 1993). La prevención de los defectos cromosómicos es por lo tanto una tarea de fundamental importancia (Fraser 1987). Los primeros esfuerzos en este sentido datan de 1955-70, y a partir de entonces, el diagnóstico prenatal se ha perfeccionado y popularizado en la mayoría de los países desarrollados y en vías de desarrollo (Castro y Mata 1985).

El diagnóstico cromosómico fetal mediante amniocentesis y cultivo de las células fetales

descamadas en el líquido amniótico, es el método más utilizado y forma parte de las normas de atención de la mujer embarazada de alto riesgo en la mayoría del mundo desarrollado (The American College of Obstetricians and Gynecologists 1985). El diagnóstico prenatal es un componente indispensable de los programas preventivos de genética que impulsa la Organización Mundial de la Salud (WHO working group 1984, Kuliev 1985). En algunos países de América Latina, esta actividad se ha desarrollado casi exclusivamente en el ámbito privado y los estratos sociales medio y alto (Organización Panamericana de la Salud 1987). Costa Rica es una de las excepciones y la mayoría de las embarazadas del presente estudio, único en nuestro país, provienen de la seguridad social y de las clases media y baja.

Este trabajo muestra la experiencia del diagnóstico fetal citogenético en Costa Rica a propósito de los primeros 175 casos estudiados a partir de 1986 y hasta 1992. Se muestra que la

amniocentesis para detectar anomalías cromosómicas es un procedimiento seguro y confiable que puede contribuir a embarazos mejor manejados desde el punto de vista obstétrico y a disminuir la carga de las cromosomopatías desde la perspectiva salubrista.

## MATERIAL Y METODOS

En este estudio prospectivo se identificaron los embarazos con alto riesgo de cromosomopatía fetal en la consulta prenatal y en la Unidad de Perinatología del "Hospital Rafael Angel Calderón Guardia" (ciudad de San José, Costa Rica), donde previa aceptación informada la paciente se sometió voluntariamente a una amniocentesis. Así obtuvimos 182 muestras de líquido amniótico, de mayo de 1986 a noviembre de 1992. El 82% de las pacientes se atendía en la Caja Costarricense de Seguro Social y el 18% provenían de la consulta médica privada. Estas 182 muestras de líquido amniótico pertenecían a 175 pacientes, ya que a siete de ellas se les repitió la punción, en cuatro ocasiones se debió al fracaso del primer cultivo y en dos casos se necesitó confirmar o descartar un diagnóstico presuntivo inicial. La amniocentesis se efectuó en todas las edades gestacionales comprendidas entre las semanas 14 a 37. En casi todos los casos el líquido se trasladó al laboratorio de cultivo celular del Instituto de Investigaciones en Salud en un lapso no mayor de tres horas. En dos oportunidades se realizó cordocentesis en dos productos polimalformados del tercer trimestre. La sangre periférica así obtenida se procesó para análisis citogenético de la manera usual (Barch *et al.* 1991).

**Amniocentesis:** Se realizó en todas aquellas pacientes identificadas como de alto riesgo genético (edad materna igual o superior a 35 años, ella o el padre del feto es portador de una translocación o una inversión cromosómica, antecedente de defecto cromosómico o feto polimalformado en un embarazo anterior, el examen por ultrasonido revela embarazo anormal), una vez informadas de los beneficios e inconveniencias de los procedimientos diagnósticos y luego de que firmaron la fórmula de consentimiento. La punción fué transabdominal, guiada por ultrasonido, según técnicas usuales (Queenan 1985). El aparato de ultrasonido utilizado fue ADR modelo 4000 SL con transductor lineal de 3.5 MH y

transductor sectorial de 3.5 MH. Al mismo tiempo se interrogó a la paciente sobre antecedentes médicos, heredo-familiares, gineco-obstétricos, y esta información, junto con los detalles del procedimiento de amniocentesis, se registraron en un formulario precodificado. Las pacientes fueron citadas siete días después de la punción para verificar vitalidad fetal y determinar la presencia o no de complicaciones. Esta información se recogió en este mismo formulario, lo mismo que los datos de laboratorio de citogenética.

**Seguimiento del embarazo y del parto:** En otro formulario precodificado se registró toda la información pertinente a la evolución del embarazo y parto. Los datos fueron recogidos al final de cada año de estudio, ya sea por medio de los expedientes clínicos o por entrevista con la paciente.

**Evaluación del recién nacido:** Esta información se recogió y se registró de la misma manera. Los recién nacidos fueron valorados por neonatólogos del Hospital Calderón Guardia y otros hospitales y clínicas.

**Cultivo celular y análisis cromosómico:** La muestra consistió en aproximadamente 30 ml de líquido amniótico recogidos en tres tubos plásticos de centrifugar estériles, cada uno con alrededor de 10 ml, numerados del uno al tres, de acuerdo con el orden de extracción. El líquido se centrifugó (1000 RPM por diez minutos) y bajo estricta asepsia, cada botón celular se suspendió en 5 ml de cada uno de tres medios de cultivo: Dulbecco A y B complementado con suero fetal bovino al 20% (SIGMA N° D5523 y F4884) y a partir de agosto de 1992, en medio Chang C (Irvine Scientific N° T103-000). La suspensión celular se incubó en tres botellas plásticas de cultivo de tejidos de 25 cc y se gasificó con una mezcla de 5% CO<sub>2</sub> en aire durante 15 segundos o hasta adecuar el pH. Las botellas se incubaron a 37°C y pasados unos cinco a siete días se les cambió el medio de cultivo y se valoró el crecimiento celular. Se reexaminaron y se les cambió el medio cada dos o tres días hasta que alcanzaron el número suficiente para ser cosechadas. Tres y media horas antes de cosechar se agregó a cada botella 0.05 ml de Colcemid (GIBCO No.120-5212 AD). Se realizó cosecha en masa con una solución de tripsina 5% y verseno (1:100). El choque hipotónico se efectuó con 10 ml de una solución de NaCl al 0.3% a 37°C durante diez minutos. Se realizó una sola fijación con 10 ml de una solución 1:3

de ácido acético y metanol por una hora. Las preparaciones cromosómicas se secaron al aire y se incubaron a 60°C durante la noche. Al día siguiente se bandearon (GTG) y analizaron utilizando la nomenclatura (ISCN 1978) y recomendaciones internacionales (Knutsen *et al.* 1989).

## RESULTADOS

De las 182 amniocentesis, el 20% se realizaron en las semanas gestacionales 14 a 16, el 27% durante las semanas 17 y 18, el 16% en las semanas 19 y 20 y el 18% en las semanas 21 a 27 de edad gestacional. Durante el segundo trimestre de gestación se efectuó el 81% de las punciones, y el 19% durante el tercer trimestre (semanas 28 a 37). Estos porcentajes variaron en los diferentes años (Fig.1).

El motivo de amniocentesis más frecuente fue edad materna igual o mayor que 35 años (64% de los casos), seguido de examen ultrasonográfico anormal (13.7%), lo cual incluye oligo y polihidramnios, retardo del crecimiento intrauterino y malformaciones de la estructura fetal. Por el antecedente de un hijo vivo o muerto portador de cromosopatía se indicó la punción en 2.9% casos y por historia de malformaciones múltiples en un embarazo anterior en el 4%. Otra indicación poco frecuente fue la presencia de una translocación o una inversión cromosómica en el padre o la madre (2.3%). Entre las indicaciones diversas se incluyen el antecedente de defectos congénitos o trisomía en la familia, historia de exposición pasada a clastógenos o mutágenos, excesiva ansiedad materna por la condición fetal y otras (13.1%). La edad materna avanzada en las pacientes con

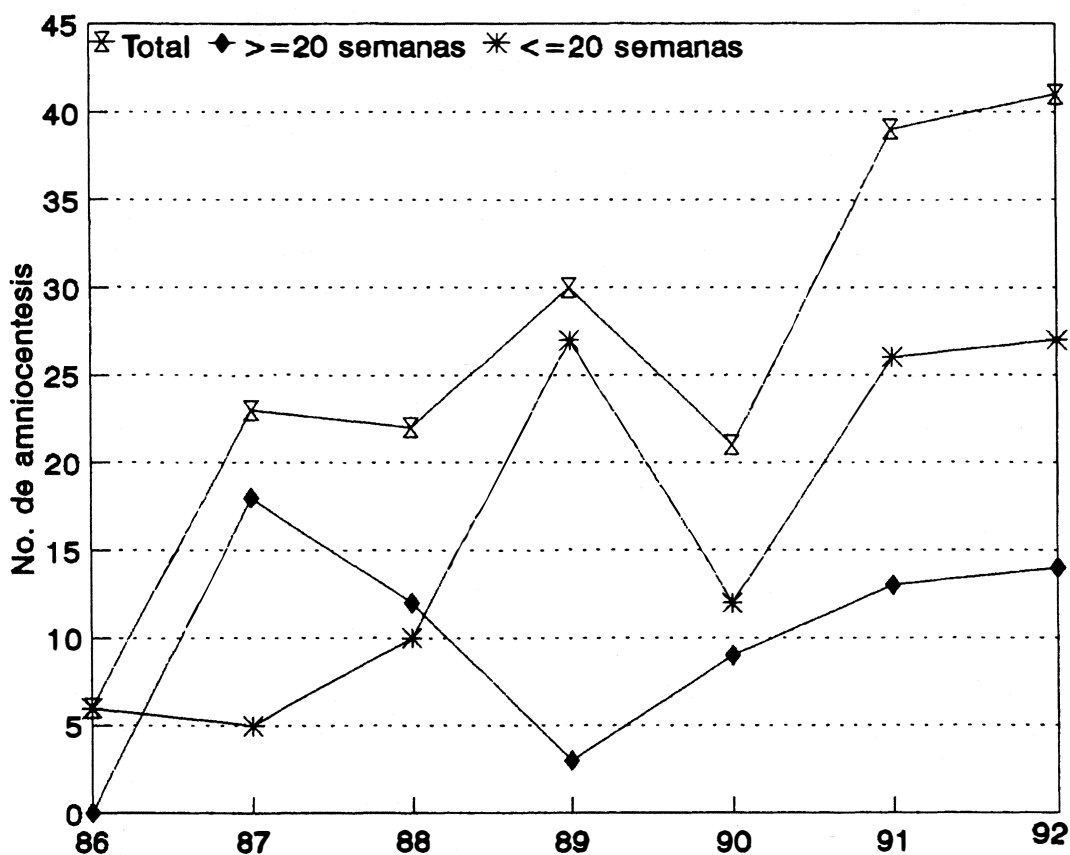


Fig. 1. Número de amniocentesis realizadas en la primera y segunda mitad del embarazo según el año de estudio.

esta indicación osciló entre los 35 y 46 años, el promedio fue 39 años y la moda 41 años.

El porcentaje de éxito en la obtención del cariotipo fetal a partir de la muestra de líquido amniótico ha sido muy variable en los diferentes períodos y por diversas razones. Los motivos de fracaso han sido principalmente contaminación bacteriana del cultivo celular y crecimiento deficiente del mismo. Estas dos complicaciones se han presentado de manera diferente en los distintos años de estudio (Cuadro 1). Durante el año 1987 se presentó un pico de no crecimiento celular que probablemente obedeció a que durante este año, el 78% de las muestras fueron de la segunda mitad del embarazo, y el promedio de edad gestacional de los cultivos que fracasaron en crecer fue de 30 semanas. En 1988 en cambio, aunque poco más de la mitad de las muestras provenían de embarazos en su segunda mitad, el promedio de edad gestacional de estos líquidos fue de 26 semanas y todos los cultivos crecieron (Fig. 1 y Cuadro 1). Durante 1989, de los nueve cultivos que no crecieron, seis se vieron afectados por hipotermia producto de dos episodios prolongados de interrupción en el flujo eléctrico que abastece el INISA, uno de 16

horas y otro de todo un fin de semana. Esta situación no se ha repetido desde entonces. Los problemas de crecimiento celular de 1990 se explican por dificultades en el laboratorio para mantener el pH óptimo de los cultivos durante las primeras horas después de iniciado el mismo. A partir de 1991, las deficiencias en el crecimiento celular son cada vez más esporádicas. Los fracasos por contaminación bacteriana de los cultivos fueron nuestra preocupación constante desde mayo de 1989 hasta junio de 1991 inclusive. Durante estos dos años nos vimos obligados a compartir el laboratorio de cultivo celular con personal sin dominio de la técnica estéril. El porcentaje de contaminación cayó de 46 a 4% y se ha mantenido inferior a 5% desde entonces.

Los cariotipos fetales anormales detectados mediante amniocentesis fueron tres y uno más mediante cordocentesis, para un 3.7% de cromosomopatía en 109 cariotipos obtenidos. Estos cuatro casos defectuosos correspondieron a embarazadas de 26 y más semanas de edad gestacional con examen por ultrasonido anormal (Cuadro 2). El cariotipo femenino con un cromosoma de más, un isocromosoma del brazo largo del cromosoma X, se encontró en un pri-

CUADRO 1

*Resultado de los cultivos de células fetales provenientes en el líquido amniótico según los diferentes años de estudio*

Cultivo	Año							Total
	1986 N=6	1987 N=23	1988 N=22	1989 N=30	1990 N=21	1991 N=39	1992 N=41	
46,XX*	1	3	13	9	2	9	18	55
46,XY*	1	1	6	6	0	15	19	48
No creció	4	16(70)**	0	9(30)	8(38)	4(10)	1(2)	42
Contaminado	0	3(13)	2(9)	6(20)	10(48)	10(26)	2(5)	33
C.anormal*	0	0	1***	0	1	1	1	4
Exitoso(%)	33	17	91	50	14	64	93	

\*: 46,XX: cariotipo fetal femenino normal, 46,XY: cariotipo masculino normal, C. anormal: cariotipo fetal anormal.

\*\* : entre parentésis el porcentaje.

\*\*\*: pseudomosaico cromosómico, el cariotipo fetal real fue femenino normal.

## CUADRO 2

*Cariotipos fetales anormales identificados mediante el análisis de células fetales obtenidas a través de 107 amniocentesis y dos cordocentesis*

Caso	Tipo de anomalía cromosómica	Indicación de estudio*	Desenlace obstétrico
LA88-24	Pseudomosaico 46,XX/47,XX,+i(Xq)	E.M.A. (35)	Niña normal
LA90-19	Mosaico 46,XY/46,XY,del(21)(q22)	E.M.A. (46)+ RCIU	Obito fetal
LA91-21	Síndrome de Down 47,XY,+21	RCIU	Obito fetal
LA92-16	Mosaico 46,XX/92,XXXX	E.M.A. (40)+ Feto polimalformado	Obito fetal
SF92-1	46,XY,der21,t(8;21)mat	Feto polimalformado	Obito fetal

\* E.M.A.: Edad materna avanzada, entre paréntesis la edad, RCIU: Retardo del crecimiento intrauterino simétrico.

mer cultivo, pero al repetir la amniocentesis por la alta probabilidad de que correspondiera a un pseudomosaico, el resultado fue cariotipo normal. El cociente sexual fue 0.9 (Cuadro 1).

El tiempo que transcurrió desde el día que se sembraron las células fetales hasta el día que se obtuvo el diagnóstico final, varió poco durante los cinco primeros años en que osciló entre 22 y 25 días como promedio. A partir de 1991 la demora empezó a disminuir hasta alcanzar un promedio de 16 días en 1992.

De las 175 pacientes estudiadas, fue posible seguir a 116 (66%). No se presentaron casos con hidrorrea, sangrado, fiebre, aborto ni otra complicación excepto dolor cólico en hipogastrio (el 8% de las veces) en los primeros siete días posteriores a la punción. En la evolución posterior del embarazo y del parto no se encontraron anomalías relacionadas con la amniocentesis. En los recién nacidos se encontró concordancia absoluta entre el cariotipo y el fenotipo, lo mismo que entre el diagnóstico ultrasonográfico fetal y la condición del neonato. No se detectó secuelas de la punción en ninguno de los niños.

## DISCUSION

El diagnóstico fetal precoz, mediante amniocentesis y cultivo de las células descamadas por el feto, se realiza generalmente alrededor de la semana 16 de gestación, de manera que el cariotipo esté disponible antes de que el embarazo llegue a su mitad. En nuestro medio esto es difícil (47% de los casos), particularmente entre las mujeres asistidas por la seguridad social (82% de la población estudiada). Las razones más importantes probablemente son el inicio tardío del control prenatal, común entre las madres añosas y múltiparas, y los largos intervalos de tiempo que transcurren hasta la obtención de las citas.

En cuanto a las indicaciones de amniocentesis, edad materna superior a 35 años, es la más frecuente en todos los centros de diagnóstico prenatal del mundo y aunque generalmente sobrepasa el 80%, cifras similares a las nuestras no son infrecuentes (Castro y Mata 1985). Por el antecedente de producto anterior con múlti-

ples malformaciones congénitas, en Nueva York se realiza amniocentesis con una frecuencia de 0.6% (Benn *et al.* 1985), ya que en los países desarrollados los productos polimalformados se estudian exhaustivamente y sólo aquellos casos susceptibles de diagnóstico prenatal en un embarazo posterior se refieren para amniocentesis por este antecedente. En Costa Rica esto no es así, de modo que es imposible estimar el riesgo de recurrencia en embarazos posteriores y seleccionar los casos con verdadera indicación de amniocentesis, por lo que en nuestra casuística alcanza la cifra de 4%. Cuando uno de los padres es portador de una translocación o una inversión, el riesgo de que traigan al mundo un bebé con exceso o con déficit de material genético es mayor que el riesgo que posee el grupo de edad materna avanzada (Castro y Mata 1985). En la experiencia mundial esta indicación representa por lo general menos del 5% de los casos (Hsu 1992), lo que concuerda con nuestros datos. Otra indicación de amniocentesis muy importante es el antecedente de anomalía cromosómica en un niño previo (2.3% de nuestros casos y 2.9% de los casos de Nueva York, Benn *et al.* 1985). Las embarazadas menores de 30 años con este antecedente, tienen un riesgo de recurrencia de defecto cromosómico en el bebé, aproximadamente 20 veces mayor que el de las madres de la misma edad sin esta historia (Hsu 1992). La amniocentesis se utiliza, lo mismo que la cordocentesis y biopsia de placenta, para obtener el cariotipo fetal ante la presencia de examen ultrasonográfico anormal, ya que el diagnóstico es útil aún durante el tercer trimestre, para planear el manejo obstétrico y pediátrico óptimo del caso y para que el consejo genético apropiado y oportuno permita a los padres prepararse de la mejor manera para recibir a un niño afectado y así minimizar el daño ocasionado por el defecto cromosómico (Wladimiroff *et al.* 1988, Eydoux *et al.* 1989, Philip 1992).

Un estudio reciente (Eydoux *et al.* 1989) informa un 13% de cromosomopatía fetal en 936 casos estudiados en el segundo y tercer trimestre, después de que la ecografía detectó retardo del crecimiento fetal, poli u oligohidramnios y malformaciones fetales, y cariotipos anormales en 3.2% de 6515 amniocentesis realizadas por edad materna igual o superior a 38 años. Esta puede ser la explicación de nuestro hallazgo de cromosomopatía sólo en los casos de ultrasoni-

do anormal. En el pseudomosaicismo, caso LA88-24 (Cuadro 2), las células con cariotipo anormal se originan *in vitro* o se derivan de tejido placentario y no representan, por lo tanto, la condición cromosómica fetal. En cuatro grandes encuestas, estadounidense, canadiense y europea, con casi 140.000 amniocentesis, la frecuencia promedio de mosaicismo cromosómico verdadero fue 0.2%, y la de pseudomosaicismo en el que más de una célula muestra la misma anomalía (como el caso nuestro que presentó un isocromosoma del brazo largo del cromosoma X de más) fue 0.9% (Hsu 1992). Se han establecido pautas bien definidas que permiten diferenciar el pseudomosaico del verdadero cariotipo del producto (Knutsen *et al.* 1989, Priest 1991, Hsu 1992), las cuales seguimos.

En cuanto a la demora para obtener el cariotipo fetal, el laboratorio de diagnóstico prenatal de la ciudad de New York informa un tiempo promedio para completar el análisis de 21 días (Benn *et al.* 1985). Este dato es similar a nuestros tiempos promedio hasta 1991. Actualmente, y gracias al uso generalizado de un medio de cultivo específicamente diseñado para el cultivo de "amniocitos" (medio de Chang), la meta en la mayoría de los laboratorios es obtener el diagnóstico final el 90% de las veces, en catorce días o menos (Hsu 1992). Aunque no fue sino hasta en el mes de agosto del año 1992 en que iniciamos el cultivo en medio Chang, esta nueva mejora se refleja en los resultados de ese año.

Los datos obtenidos hasta el momento nos indican que el diagnóstico prenatal mediante amniocentesis es un procedimiento confiable, ya que no tuvimos errores diagnósticos, y seguro, pues no hay evidencia de riesgos ni secuelas relacionados con la punción.

En Costa Rica, los impedimentos legales restringen la amplia utilización de la información que proporciona el diagnóstico prenatal con fines preventivos. No obstante, la historia del desarrollo de este servicio en la mayoría de los países donde ahora se practica de rutina (Organización Panamericana de la Salud 1987), permite preveer que también en este país la aceptación social de los beneficios del diagnóstico fetal, será la solución al problema de esta legislación obsoleta. El problema ético que a nuestro juicio es más grave y de mucha mayor magnitud que la ínfima contribución del aborto por defecto fetal a las cifras de aborto inducido por

problemas socioeconómicos (oficiales y extraoficiales), es el problema de acceso al servicio por parte de las pacientes con embarazo de alto riesgo. En Latinoamérica se benefician sólo las que pueden pagarlo, con algunas excepciones (Organización Panamericana de la Salud 1987).

### AGRADECIMIENTO

A obstetras y neonatólogos que en su paso por el Hospital Calderón Guardia colaboraron con nosotros y a Ramiro Barrantes Mesén por su decisivo apoyo. Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, proyecto No. 742-84-115.

### RESUMEN

De 1986 a 1992 se realizaron 182 amniocentesis entre las semanas 14 a 37 de gestación, y dos cordocentesis del tercer trimestre en 1992, para obtener el cariotipo fetal. Todos los embarazos eran de alto riesgo genético, generalmente por edad materna avanzada o por examen ultrasonográfico anormal. Se cultivaron las células fetales utilizando el sistema cerrado y la cosecha en masa. Se detectó 3.7% de cromosomopatía fetal. El tiempo promedio que se demoró el diagnóstico fue de tres semanas hasta 1991 inclusive y de dos en 1992. El éxito de los cultivos varió durante los diferentes años, en 1992 se obtuvo resultados el 93% de las veces. No se detectaron errores en el diagnóstico citogenético ni secuelas o complicaciones asociadas a la punción. Se encontró que la amniocentesis es un procedimiento seguro y confiable que permite el diagnóstico citogenético fetal y posibilita un mejor manejo obstétrico del embarazo de alto riesgo.

### REFERENCIAS

- Barch, M.J., H.J. Lawce & M.S. Arsham. 1991. Peripheral Blood Culture, p. 17-30. *In* M.J. Barch, (ed.). The ACT Cytogenetics Laboratory Manual. 2nd ed. Raven, Nueva York.
- Benn, P.A., L.Y.F. Hsu, A. Carlson & H.L. Tannenbaum. 1985. The centralized prenatal genetics screening program of New York city III: the first 7000 cases. *Am. J. Med. Genet.* 20: 369-384.
- Castro, I. & L. Mata. 1985. El diagnóstico prenatal de trastornos genéticos. *Acta Med. Cost.* 28:84-91.
- Eydoux, P., A. Choiset, N. Le Porrier, F. Thépot, S. Szpiro-Tapia, J. Alliet, S. Ramond, J.F. Viel, E. Gautier, N. Morichon, N. & S. Girard-Orgeolet. 1989. Chromosomal prenatal diagnosis: study of 936 cases of intrauterine abnormalities after ultrasound assessment. *Prenat. Diagn.* 9: 255-268.
- Fraser, F.C. 1978. Prevention of birth defects: how are we doing?. *Teratology* 17: 193-202.
- Hsu, L.Y.F. 1992. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities through amniocentesis. p. 155-210. *In* A. Milunsky (ed.) Genetic disorders and the fetus. 3d. ed. Johns Hopkins, Baltimore.
- Knutsen, T., H. Bixenman, P. Lawce & P. Martin. 1989. Chromosome analysis guidelines. Preliminary report. *Karyogram* 15: 131-135.
- Kuliev, A. 1985. Perspectives in fetal diagnosis of congenital disorders. (Sero Symposium Review, No. 8). Sero Symposium, Roma. 12p.
- Morgan, R.A. & W.F. Anderson. 1993. Human gene therapy. *Annu. Rev. Biochem.* 62:191-217.
- Organización Panamericana de la Salud. 1987. Ejecución de las actividades de salud de genética en América Latina y el Caribe. Informe de la reunión de un grupo de expertos en genética médica. La Habana, Cuba. 30p.
- Philip, J. 1992. The prenatal diagnosis and management of congenital malformations in the third trimester of pregnancy. p. 683-719. *In* A. Milunsky (ed.). Genetic disorders and the fetus. 3d ed. Johns Hopkins, Baltimore.
- Priest, J.H. 1991. Prenatal chromosomal diagnosis and cell culture, p. 149-203. *In* M.J. Barch, (ed.). The ACT cytogenetics laboratory manual. 2nd ed. Raven, Nueva York.
- Queenan, J.T. 1985. Amniocentesis, p. 201-213. *In* Management of high-risk pregnancy. 2nd ed. Medical Economics Books, Nueva Jersey.
- Summers, D. & G. Clarke. 1988. Recent developments in clinical cytogenetics. *Med. Lab. Sci.* 45:318-323.
- The American College of Obstetricians and Gynecologists. 1985. Standards for Obstetric-Gynecologic Services. The American College of Obstetricians and Gynecologists, Washington D.C. 102p.
- WHO working group. 1984. Fetal diagnosis of hereditary diseases. *Bull. WHO.* 62:345-355.
- Wladimiroff, J. W., E.S. Sacks, A. Reuss, P.A. Stewart, L. Pijpers & M.F. Niermeijer. 1988. Prenatal diagnosis of chromosome abnormalities in the presence of fetal structural defects. *Am. J. Med. Genet.* 29:289-291.