


UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk

brought to you by  **CORE**

provided by Repositori d'Objectes Digitals per a l'Ensenyament la Re

Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia
Programa de Doctorado en Medicina



**INFLUENCIA DE LAS TÉCNICAS DE
REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN EL CRIBADO DE
ANEUPLOIDÍAS DE LAS 11-13 SEMANAS**

Tesis doctoral presentada por

Cristina Casanova Pedraz

Licenciada en Medicina

Valencia, 2013

**DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y
GINECOLOGÍA. FACULTAD DE MEDICINA DE VALENCIA**

**INFLUENCIA DE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN
ASISTIDA EN EL CRIBADO DE ANEUPLOIDÍAS DE LAS
11-13 SEMANAS**

AUTORA:

Cristina Casanova Pedraz. Licenciada en Medicina y cirugía

DIRECTORES:

Vicente Serra Serra

Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI), Universidad de Valencia

José Bellver Pradas

Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI), Universidad de Valencia

Nicolás Garrido Puchalt

Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI), Universidad de Valencia

**Memoria de Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor en
Medicina y Cirugía**

UNIVERSIDAD DE VALENCIA



Prof. VICENTE SERRA SERRA

Catedrático de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Valencia, Director de la Unidad de Medicina Materno-Fetal del Instituto Universitario IVI Valencia

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: "***Influencia de las técnicas de reproducción asistida en el cribado de aneuploidías de las 11-13 semanas***" ha sido realizado íntegramente por **Dña. Cristina Casanova Pedraz** bajo mi dirección. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 23 de Abril de 2013.

Fdo. Vicente Serra Serra



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Prof. José Bellver Pradas

Profesor Asociado de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de Valencia, Universidad de Valencia, España

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: "Influencia de las técnicas de reproducción asistida en el cribado de aneuploidías de las 11-13 semanas" ha sido realizado íntegramente por Dña. Cristina Casanova Pedraz bajo mi dirección. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 18 de Abril de 2013.

Fdo.



Prof. Nicolás Garrido Puchalt

Director del Laboratorio de Andrología y Banco de Semen del Instituto Universitario IVI (Instituto Valenciano de Infertilidad) de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: "Influencia de las técnicas de reproducción asistida en el cribado de aneuploidías de las 11-13 semanas" ha sido realizado íntegramente por Dña. Cristina Casanova Pedraz bajo mi dirección. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 18 de Abril de 2013.

Fdo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que me han ayudado y apoyado en la consecución de este proyecto a lo largo de estos años:

En primer lugar agradecer a mis directores de tesis: Vicente Serra, Pepe Bellver y Nicolás Garrido por su ayuda, su cercanía, su paciencia su capacidad de docencia, su calidad profesional y humana, su trabajo y sus conocimientos en reproducción asistida, medicina fetal, investigación y bioestadística, de los que he aprendido mucho y sin los cuáles no hubiera sido posible realizar este trabajo.

A mis padres su apoyo incondicional, su ayuda mediante su experiencia y conocimientos y su confianza en mí. En especial a mi padre por todo el esfuerzo y tiempo que ha dedicado en ayudarme y animarme.

Al Dr. Pellicer que me impulsó y me dio los medios para realizar este trabajo además de inculcarme el interés por la reproducción asistida y la investigación.

Al equipo del IVI por su increíble labor asistencial e investigadora.

A Maia Brik por su ejemplo, sus conocimientos en bioestadística, por transmitirme sus ánimos, y su gusto por la medicina fetal y la investigación.

A Mónica Cruz por ayudarme con el EndNotes

A mi familia, a mis amigos, abuelos y a mi hermana por su incondicional apoyo, su compañía y ánimos en todos mis proyectos y en este en particular.

INDICE

| | Pag. |
|--|-------------|
| GLOSARIO | 11 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 13 |
| 1.1 Marcadores de aneuploidías | 19 |
| 1.1.1 Marcadores bioquímicos | 23 |
| 1.1.1.1 Alfa-fetoproteína (AFP) | 25 |
| 1.1.1.2 Gonadotropina coriónica humana (hCG) y β -hCG libre | 27 |
| 1.1.1.3 Estriol no conjugado (uE3) | 31 |
| 1.1.1.4 Inhibina A | 31 |
| 1.1.1.5 Proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) | 33 |
| 1.1.2 Marcadores ecográficos | 36 |
| 1.1.2.1 Translucencia nucal (TN) | 36 |
| 1.1.2.2 Otros marcadores ecográficos | 40 |
| 1.2 Cribado combinado | 41 |
| 1.2.1 Segundo trimestre | 41 |
| 1.2.2 Primer Trimestre | 43 |
| 1.3 Marcadores del síndrome de Down y técnicas de reproducción asistida (TRA) | 45 |
| 1.3.1 Efecto de las TRA en los marcadores ecográficos del cribado del primer trimestre | 48 |
| 1.3.2 Efecto de las TRA en los marcadores bioquímicos del cribado del primer trimestre | 50 |
| 1.3.3 Posibles teorías sobre las diferencias en los marcadores bioquímicos en gestaciones obtenidas mediante TRA | 57 |

| | | |
|----------|---|----|
| 1.3.3.1 | Infertilidad | 57 |
| 1.3.3.2 | Múltiples cuerpos lúteos y lugares de implantación | 59 |
| 1.3.3.3 | Complicaciones obstétricas | 59 |
| 1.3.3.4 | Vanishing twin | 60 |
| 1.3.3.5 | Momento de la realización del test bioquímico | 61 |
| 1.3.3.6 | Estimulación hormonal | 61 |
| 2. | HIPÓTESIS | 64 |
| 3. | OBJETIVOS | 65 |
| 3.1. | Principal | 65 |
| 3.2. | Secundarios | 65 |
| 4. | PACIENTES Y MÉTODO | 66 |
| 4.1. | Diseño | 66 |
| 4.2. | Pacientes | 66 |
| 4.2.1. | Población estudiada | 66 |
| 4.2.2. | Criterios de inclusión y exclusión | 66 |
| 4.3. | Método | 67 |
| 4.3.1 | Grupos a estudio según el modo de concepción | 67 |
| 4.3.1.1. | Inseminación artificial (IA) | 70 |
| 4.3.1.2. | Fecundación in vitro (FIV) | 70 |
| 4.3.1.3. | Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) | 70 |
| 4.3.1.4. | Ovodonación | 71 |
| 4.3.1.5. | Transferencia de embriones congelados | 71 |
| 4.3.2. | Variables a estudio | 75 |
| 4.3.2.1. | Resultado del cribado de aneuploidías | 75 |
| 4.3.2.2. | Datos epidemiológicos | 75 |

| | |
|--|-----|
| 4.3.2.3. Causa de esterilidad | 76 |
| 4.3.2.4. Tipo de concepción | 76 |
| 4.3.2.5. Parámetros clínicos y de laboratorio | 76 |
| 4.3.2.5.1. Protocolo de estimulación ovárica | 76 |
| 4.3.2.5.2. Dosis y tipo de gonadotropinas administradas | 78 |
| 4.3.2.5.3. Diagnóstico genético preimplantacional (DGP) | 78 |
| 4.3.2.5.4. Embrioreducción (vanishing) | 79 |
| 4.3.3. Análisis estadístico | 80 |
| 5. RESULTADOS | 81 |
| 5.1 Población a estudio | 81 |
| 5.2 Resultados según el tipo de concepción | 84 |
| 5.2.1 Gestaciones obtenidas tras TRA vs gestaciones naturales | 84 |
| 5.2.2 Gestaciones obtenidas tras IA vs gestaciones naturales | 86 |
| 5.2.3 Gestaciones obtenidas tras FIV o ICSI vs gestaciones naturales | 88 |
| 5.2.4 Gestaciones obtenidas tras FIV o ICSI teniendo en cuenta la congelación embrionaria y si los ovocitos fueron propios o donados | 90 |
| 5.3 Influencia de la estimulación hormonal | 98 |
| 5.4 Parámetros clínicos y de la laboratorio | 101 |
| 5.4.1 Protocolo de estimulación ovárica: agonistas de la GnRH (protocolo largo) vs antagonistas de la GnRH (protocolo corto) | 101 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 5.4.2 | Tipo de gonadotropinas utilizadas en la estimulación ovárica: FSH vs actividad LH (LH/hMG) vs otros | 103 |
| 5.4.3 | Dosis total de gonadotropinas administradas | 105 |
| 5.4.4 | Etiología de la infertilidad (masculina, femenina, mixta) | 107 |
| 5.4.5 | Influencia del diagnóstico genético preimplantacional (DGP) | 108 |
| 5.6 | Influencia de la embriorreducción (vanishing) | 109 |
| 6. | DISCUSIÓN | 110 |
| 6.1. | Marcadores ecográficos | 111 |
| 6.2. | Marcadores bioquímicos | 113 |
| 6.3. | Hipótesis fisiopatológicas sobre los cambios del PAPP-A en TRA | 116 |
| 6.4. | Ajuste del cribado del primer trimestre en TRA | 125 |
| 6.5. | Consideraciones finales | 127 |
| 7. | CONCLUSIONES | 129 |
| 8. | BIBLIOGRAFÍA | 131 |

GLOSARIO

- AFP: alfa fetoproteína
- α -hCG: fracción alfa libre de la gonadotropina coriónica humana
- β -hCG: fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana
- BVC: biopsia de vellosidades coriales
- DGP: diagnóstico genético preimplantacional
- FISH: fluorescent in situ hybridization
- FIV: fecundación in vitro
- FMF: Fetal Medicine Foundation
- GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas
- hCG: gonadotropina coriónica humana
- hMG: gonadotropina menopáusica humana
- IA: inseminación artificial
- IAD: inseminación artificial con semen de donante
- IAH: inseminación artificial homóloga
- ICSI: intracytoplasmic sperm injection
- IGFBP: insulin like growth factor binding protein
- IMC: índice de masa corporal
- IVI: Instituto Valenciano de infertilidad
- LCC: longitud cráneo-caudal

- LH: hormona luteinizante
- MoM: Múltiplos de la mediana
- PAPP-A : proteína plasmática A asociada al embarazo
- QF-PCR: quantitative fluorescent polymerase chain reaction
- TN: translucencia nugal
- TRA: técnicas de reproducción asistida
- uE₃: estriol no conjugado

1 INTRODUCCIÓN

Las anomalías cromosómicas constituyen la base de una amplia variedad de malformaciones fetales, siendo una de las principales causas de muerte perinatal y el origen de discapacidad importante durante la infancia y la edad adulta. La detección de este tipo de anomalías es uno de los objetivos principales del diagnóstico prenatal y la indicación más frecuente para la realización de un examen prenatal invasivo.

La incidencia de anomalías cromosómicas depende de la población evaluada. En la población general, los defectos cromosómicos compatibles con la vida pero causantes de significativa morbilidad (síndrome de Down, Turner, Klinefelter, Patau, Edwards, entre otros), ocurren en el 0,65% de los neonatos¹. Todas las mujeres tienen un riesgo de que su feto presente un defecto cromosómico y este riesgo a priori depende de la edad materna y de la edad gestacional: de tal modo que el riesgo aumenta conforme lo hace la edad materna y disminuye a medida que avanza el embarazo, dado que los fetos con defectos cromosómicos tienen más probabilidades de morir dentro del útero en comparación con los fetos sanos (Tabla 2)². El riesgo individual de cada paciente de presentar un feto con cromosomopatía se calcula multiplicando el riesgo a priori por una serie de coeficientes de

probabilidad que dependen del resultado obtenido en los test de cribado², realizados como después se comentará.

Hace años, se ofrecía a las mujeres desde los 35 años la realización de una amniocentesis genética, pues a partir de esta edad la incidencia de aneuploidías especialmente trisomías, comienza a aumentar rápidamente¹.

El síndrome de Down es la anomalía cromosómica más frecuente compatible con la vida³ y en su mayoría se debe a la falta de disyunción del cromosoma 21 durante la meiosis materna⁴. La mayoría (97%), de los embarazos con síndrome de Down ocurren *de novo* en familias sin antecedentes de esta malformación o de otra aneuploidía¹.

En la tabla 1 se muestran las características fetales y neonatales del síndrome de Down.

Para una mujer de 35 años (sin antecedentes de un hijo previo afecto) el riesgo de gestar un feto con síndrome de Down es de 1/249 en la semana 12 (Tabla 2). En el caso de mujeres que hayan tenido un feto o hijo previo con trisomía 21 el riesgo de recurrencia en sucesivos embarazos es un 0,75% mayor que el riesgo basado en la edad materna y la edad gestacional. En este caso el riesgo aumenta a 1/87 en mujeres de 35 años en la semana 12 de gestación².

Tabla 1. Características fetales y neonatales del síndrome de Down

| Características fetales | |
|-----------------------------|--|
| Cabeza y Cuello | <ul style="list-style-type: none"> • Braquicefalia • Pliegues epicánticos • Puente nasal plano • Orejas pequeñas y plegadas o displásicas • Boca abierta y lengua sobresaliente • Paladar estrecho • Dientes anormales (microdoncia total o parcial) • Cuello corto y exceso de piel en la nuca |
| Extremidades | <ul style="list-style-type: none"> • Manos cortas y anchas, braquidactilia • Falange media del quinto dedo hipoplásica • Clinodactilia del 5º dedo • Pliegue palmar transversal • Deformidad de separación del dedo gordo del pie • Hiperflexibilidad de las articulaciones |
| Cardiopatías asociadas | <ul style="list-style-type: none"> • Comunicación auriculoventricular (defecto de las almohadillas endocárdicas) • Comunicación interventricular con otras lesiones o sin ellas • Comunicación interauricular aislada tipo <i>septum secundum</i> • Conducto arterioso permeable persistente aislado • Tetralogía de Fallot aislada |
| Defectos gastrointestinales | <ul style="list-style-type: none"> • Atresia o estenosis duodenal • Páncreas anular • Ano imperforado • Atresia esofágica • Enfermedad de Hirschprung |

Características neonatales

- Perfil facial plano
- Reflejo de Moro escaso
- Exceso de piel en la nuca
- Hendiduras palpebrales oblicuas
- Hipotonía
- Hiperflexibilidad de las articulaciones
- Displasia de la pelvis
- Orejas anómalas
- Displasia de la falange media del quinto dedo
- Surco palmar transversal (como el de los simios)

Adaptada de: Marcadores ecográficos de anomalías cromosómicas. Donald School: Ecografía en Obstetricia y Ginecología⁴

Tabla 2. Riesgo de trisomía 21 en función de la edad materna y la edad gestacional

| Edad materna (años) | Edad gestacional (semanas) | | | |
|---------------------|----------------------------|--------|--------|--------|
| | 12 | 16 | 20 | 40 |
| 20 | 1/1.068 | 1/1200 | 1/1295 | 1/1527 |
| 25 | 1/946 | 1/1062 | 1/1147 | 1/1352 |
| 30 | 1/626 | 1/703 | 1/759 | 1/895 |
| 31 | 1/543 | 1/610 | 1/658 | 1/776 |
| 32 | 1/461 | 1/518 | 1/559 | 1/659 |
| 33 | 1/383 | 1/430 | 1/464 | 1/547 |
| 34 | 1/312 | 1/350 | 1/378 | 1/446 |
| 35 | 1/249 | 1/280 | 1/302 | 1/356 |
| 36 | 1/196 | 1/220 | 1/238 | 1/280 |
| 37 | 1/152 | 1/171 | 1/185 | 1/218 |
| 38 | 1/117 | 1/131 | 1/142 | 1/167 |
| 39 | 1/89 | 1/100 | 1/108 | 1/128 |
| 40 | 1/68 | 1/76 | 1/82 | 1/97 |
| 41 | 1/51 | 1/57 | 1/62 | 1/73 |
| 42 | 1/38 | 1/43 | 1/46 | 1/55 |

Adaptada de: The 11-14 weeks scan²

Al igual que otras cromosomopatías, el riesgo de trisomía 21 aumenta con la edad materna y disminuye con la edad gestacional ya que un 30% de los fetos afectados mueren entre las semanas 12 y 40 de gestación².

Como en la actualidad hay muchas más mujeres gestantes en el grupo de edad menor de 35 años la mayoría de los fetos con trisomía 21 nacen en mujeres de este grupo de edad. Sin embargo, esta tendencia está cambiando por el retraso en la edad de búsqueda de embarazo en la sociedad actual.

El cribado del síndrome de Down y de otras aneuploidías ha pasado a formar parte del diagnóstico prenatal en los últimos 20-30 años en la mayoría de los países desarrollados^{5,6}.

En los años 70 y 80, el cribado de trisomía 21 se basaba únicamente en la edad materna, aconsejándose la amniocentesis o la biopsia de vellosidades coriales (BVC) a todas las gestantes de 35 años o más. En estas décadas sólo un 5% de las embarazadas tenían >35 años y esta política de cribado resultaba en un 5% de pruebas invasivas y un 30% de detección de trisomía 21².

En el momento actual, los métodos de cribado prenatal de las cromosomopatías han ampliado su objetivo, llevando a la detección de la mayoría de las aneuploidías, a diferencia de los inicios del cribado en

los que se buscaba esencialmente la trisomía 21, por ser la aneuploidía más prevalente y de mayor supervivencia. Debido a la morbilidad y riesgo de aborto de las técnicas invasivas, los procedimientos de cribado se basan en la combinación de los denominados “marcadores de aneuploidía”, es decir, parámetros biológicos, ecográficos y bioquímicos de origen materno, fetal o placentario que han demostrado presentar diferencias cuantitativas o cualitativas, estadísticamente significativas, entre los fetos afectados y no afectados de un determinado tipo de aneuploidía⁷.

1.1- MARCADORES DE ANEUPLOIDÍAS

Hay varios motivos por los que es importante que se identifique la aneuploidía fetal en una edad gestacional temprana, previa a la amniocentesis, entre estas razones está la mayor probabilidad de finalización del embarazo¹.

La historia de los marcadores de aneuploidía se inicia en 1866, cuando Langdon Down⁸ describió el síndrome que lleva su nombre y lo relacionó con la edad materna avanzada, la cual constituyó el primer marcador de esta cromosomopatía. No fue hasta pasados algo más de 100 años, en 1984, cuando I.R. Merkatz *et al*⁹ publicaron la correlación entre concentraciones bajas de alfa-fetoproteína (AFP) en suero

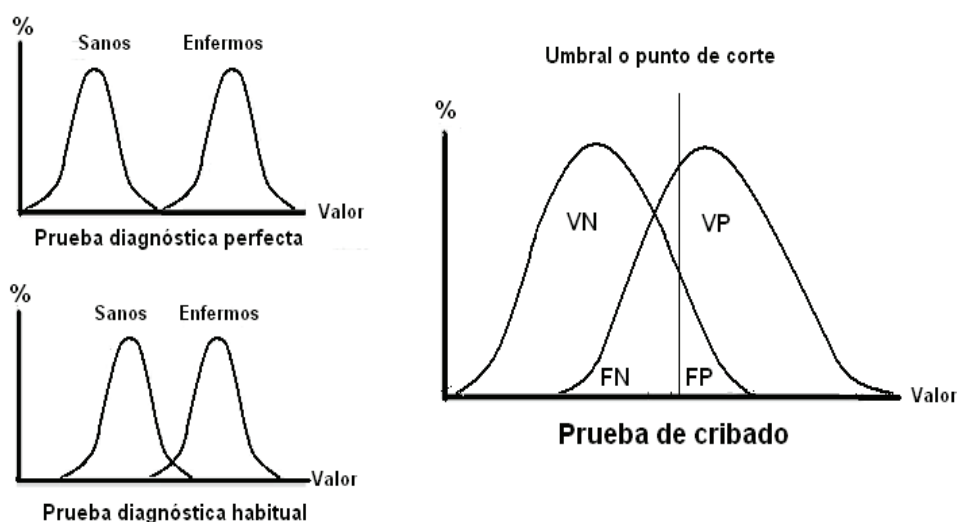
materno durante el segundo trimestre de la gestación y embarazos de fetos afectados de cromosopatías⁷. En 1984, T.Chard¹⁰ sugirió que otros marcadores podían estar alterados en el síndrome de Down, en especial la gonadotropina coriónica humana (hCG). Tres años después, en 1987, M.H.Bogart¹¹ demostró que las concentraciones séricas de la hCG estaban elevadas en el suero de las embarazadas portadoras de un feto afecto de trisomía 21. En 1988, J.A.Canick¹² demostró la asociación entre valores bajos de estriol no conjugado (uE3) en suero materno y gestaciones con fetos afectados de síndrome de Down. Posteriormente, se han publicado nuevos marcadores de trisomía 21, entre los que destacan el marcador bioquímico del primer trimestre más discriminatorio denominado proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A), cuya relación con las aneuploidías fue inicialmente descrita por B. Brambati en 1991¹³, y que se presenta disminuida en la trisomía 21¹⁴; y la inhibina A, en principio relacionada con el síndrome de Down por J.M.M. Van Lith en 1992¹⁵, propuesta como marcador adicional en el cribado del segundo trimestre ya que se encuentra aumentada en éste sobretodo en las semanas 14 y 16¹⁶. Su agregación en el primer trimestre no añadiría mayores beneficios^{17, 18}.

Cualquier parámetro relacionado con el embarazo que presente diferencias entre los fetos normales y los afectados por una aneuploidía

constituye un marcador de ésta, y será tanto más eficaz cuanto mayor sea la proporción de fetos afectados que las manifiesten llegando a constituir un método diagnóstico cuando el porcentaje se acerque al 100%⁷.

Cuando se produce cierto grado de solapamiento entre las curvas de Gauss de distribución de frecuencias de un determinado marcador para los fetos afectados y los no afectados de una aneuploidía concreta, el valor de este marcador sólo podrá ser utilizado como parámetro de cribado mientras que cuando existe una separación nítida entre ambas gráficas se considera un parámetro de diagnóstico (Figura 1). Un marcador será tanto más útil para el cribado cuanto mayor sea la separación entre ambas curvas⁷.

Figura 1. Curvas de Gauss para variables continuas que representen un método diagnóstico o de cribado respectivamente.



VN: verdaderos negativos; VP: verdaderos positivos; FN: falsos negativos; FP: falsos positivos

En la actualidad, sólo los métodos de estudio directos (cariotipo en vellosidades coriales, líquido amniótico o tejidos fetales) o indirectos de los cromosomas fetales (fluorescent in situ hybridization (FISH), quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR)) pueden considerarse métodos diagnósticos de las aneuploidías y únicamente de los cromosomas estudiados o informativos. Todos estos métodos requieren de una técnica invasiva que conlleva un riesgo de pérdida fetal, no deseado, de alrededor del 1-2%² y presentan un coste económico que los hace inviables para una utilización indiscriminada en

los programas sanitarios con financiación pública. Por ello, cabe plantearse, a nivel poblacional y para minimizar riesgos y costes, la detección prenatal de las aneuploidías desde el punto de vista de la selección previa de los fetos que presenten una mayor probabilidad de ser portadores de estas cromosomopatías. Es decir, la aplicación de los métodos de cribado y la utilización de métodos diagnósticos invasivos de confirmación, únicamente en los casos positivos. Las técnicas de cribado de las aneuploidías se basan en la valoración prenatal de muy diversos marcadores y en hacer comprensible la información que éstos proporcionan mediante estimaciones probabilísticas⁷.

1.1.1- Marcadores bioquímicos

Los marcadores bioquímicos son variables continuas cuyos valores cambian con la edad gestacional y para independizarlos de esta última se transforman habitualmente en múltiplos de la mediana (MoM). De este modo, el gráfico de las frecuencias o histograma de la transformación logarítmica decimal (LOG) de los MoM dibuja, en la mayor parte de su rango, una curva de Gauss, es decir, presentan, aproximadamente, una distribución normal. Por el contrario, la mayoría de los marcadores ecográficos morfológicos y funcionales fetales son variables discretas del tipo dicotómico o binario, es decir, admiten

únicamente valores concretos como presente-ausente, en un momento determinado de la gestación, y su tratamiento estadístico será distinto⁷.

Ya en la década de los 80 se vio que los embarazos con Síndrome de Down se asociaban con concentraciones relativamente bajas de AFP y uE₃ y concentraciones elevadas de la fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana (β -hCG) e inhibina A. Más tarde esta prueba se convirtió en una práctica habitual durante el segundo trimestre y permitió calcular el riesgo individual de síndrome de Down durante el segundo trimestre de embarazo.

En la actualidad, únicamente cinco marcadores bioquímicos se utilizan ampliamente en el cribado sistemático de las aneuploidías, en el primer y/o segundo trimestre de la gestación: AFP, β -hCG libre, uE₃, inhibina A y PAPP-A. Se ha demostrado matemáticamente que la translucencia nucal es el mejor marcador individual de trisomía 21 y la PAPP-A lo es dentro de los bioquímicos pero su poder discriminatorio disminuye rápidamente a medida que avanza la gestación, al contrario de lo que sucede con la β -hCG libre, que aumenta claramente a partir de las 13 semanas⁷.

1.1.1.1 Alfa-fetoproteína (AFP):

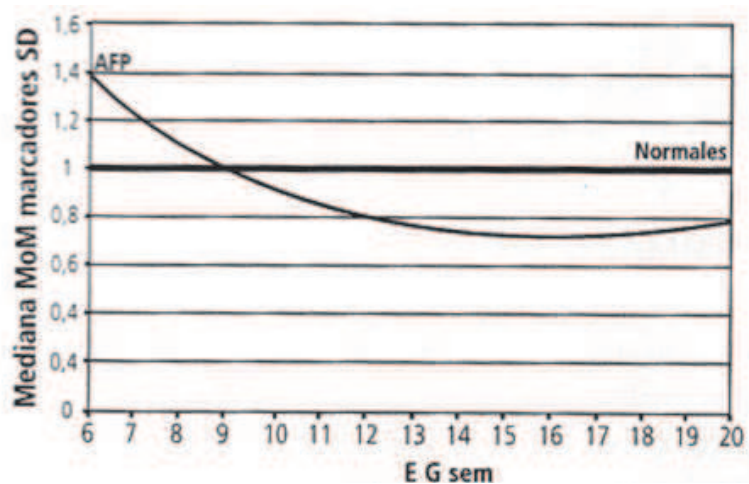
La AFP es una glucoproteína, de peso molecular 70 000D¹⁹ cuya secuencia de aminoácidos presenta un 40% de homología con la albúmina aunque es antigénicamente diferente a ésta. Está codificada por un gen situado en el cromosoma 4. Se sintetiza en el saco vitelino, en el tracto intestinal y en el hígado del feto y es posible detectarla, en suero materno, a partir de las 7 semanas de gestación, que es cuando sus concentraciones superan las basales maternas^{20, 21}. Circula en la sangre fetal y pasa a la orina fetal y al líquido amniótico. Su concentración aumenta lentamente hasta la semana 13 tanto en sangre fetal como en líquido amniótico; a partir de entonces sus niveles comienzan a descender con rapidez²². La AFP pasa a la circulación materna bien por difusión transamniótica o a través de la circulación placentaria²³.

La concentración en sangre materna es cinco veces inferior a la fetal y va aumentando durante el segundo trimestre, a partir de las 12-13 semanas debido al incremento de la permeabilidad placentaria. La AFP se encuentra aumentada en sangre materna cuando existe una malformación fetal como un defecto del tubo neural o una abertura no cubierta por tegumento en alguna parte del cuerpo, como defectos de pared abdominal, o higroma quístico, teratoma fetal, amputaciones

fetales, muerte fetal, o cuando existen tumores o defectos en la barrera placentaria (hemorragia feto-materna, tumores o infartos placentarios, placentas hipertróficas o quísticas)²⁴⁻²⁹. Cualquier mínimo compromiso en la integridad de la placenta tiene repercusiones en los niveles maternos de AFP debido al gradiente de concentración existente entre el suero fetal y el materno¹⁹.

Los valores de AFP están disminuidos en pacientes con fetos afectados por síndrome de Down⁹. El motivo por el cual sus valores están disminuidos en la trisomía 21 (Figura 2) se desconoce, pero en el segundo trimestre probablemente refleja una falta de maduración hepática y placentaria con una angiogénesis retardada^{26, 30}. Cuando existe una malformación fetal como una abertura no cubierta por tegumento (como un defecto del tubo neural) en alguna parte del cuerpo o algunos otros trastornos, los niveles séricos de AFP aumentan¹ lo que puede dar lugar a falsos negativos para la detección del síndrome de Down.

Figura 2. Evolución de la mediana de los MoM para la AFP entre las 6 y 20 semanas de gestación.



SD: síndrome de Down; EG: edad gestacional
Spencer, K. et al (2002)³¹

1.1.1.2 Gonadotropina coriónica humana (hCG) y β -hCG libre:

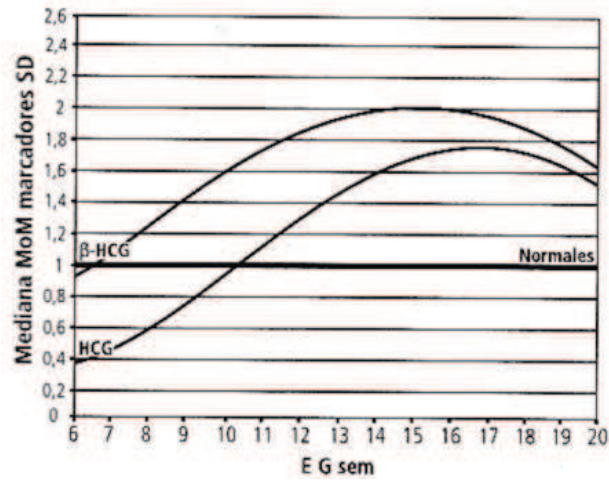
La hCG es una glicoproteína compuesta por dos cadenas o subunidades: α y β . Ambas subunidades coexisten en forma ligada (hCG intacta) y libre (fracción α -hCG libre y fracción β -hCG libre). Es producida por el sincitiotrofoblasto y probablemente también por el trofoblasto, y es posible detectarla en la circulación materna a partir de las 2-3 semanas de gestación. La subunidad α está codificada por un único gen del cromosoma 6, y la subunidad β por 6 genes del cromosoma 19. Esta molécula tiene en su superficie unos determinantes antigénicos que permiten su cuantificación mediante técnicas de inmunoensayo, tipo *sandwich*, de dos sitios que utilizan un doble

anticuerpo: uno como capturador y otro como detector. Se pueden determinar tanto los valores de la molécula entera como los de cada una de las subunidades^{32, 33}. La técnica que valora la hCG intacta consiste en la unión de un anticuerpo con la subunidad α y otro anticuerpo con el determinante antigénico ubicado sobre la superficie externa de la subunidad β estando ambos antígenos presentes, de forma simultánea, únicamente en la molécula de la hCG intacta. La técnica que detecta la denominada β -hCG total orienta el anticuerpo capturador contra un determinante antigénico situado sobre la superficie externa de la subunidad β y el anticuerpo detector contra otro determinante antigénico ubicado también sobre la superficie externa de la misma cadena, por lo que, además de detectar la cadena β ligada a la α (hCG intacta), determina la fracción libre de la cadena β (aproximadamente un 5%), con lo que se está cuantificando la suma de la molécula entera y de la fracción β -hCG libre. Por último, cuando se determina la β -hCG libre el anticuerpo capturador se dirige contra un determinante antigénico reactivo de la subunidad β , situado en la superficie de ésta, que queda libre al estar separadas las cadenas α y β y el anticuerpo detector contra el determinante antigénico situado sobre la superficie externa de la misma cadena con lo que la valoración de dicha fracción es muy específica.

También, en este caso, se desconocen los motivos por los cuales sus niveles están aumentados en la trisomía 21 durante todo el embarazo, pero parecen muy relacionados con la inmadurez placentaria o una disminución de la utilización de la hormona circulante^{11, 34}.

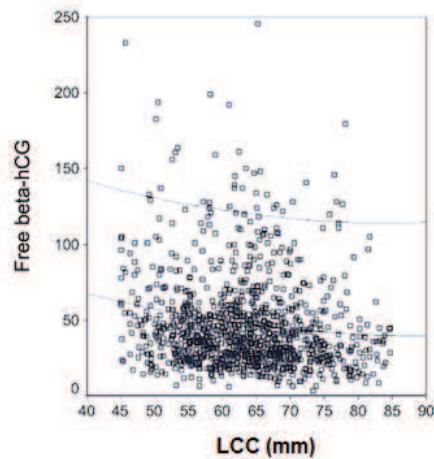
En la figura 3 aparecen representados los valores de la hCG y β -hCG en función de la edad gestacional en gestaciones con síndrome de Down y en la figura 4 los niveles de β -hCG en función de la LCC.

Figura 3: Evolución de la mediana de los MoM para la hCG y f β -hCG entre las 6 y 20 semanas de gestación.



*SD: síndrome de Down; EG: edad gestacional
Spencer, K. et al (2002)³¹*

Figura 4. Niveles de β -hCG en función de la LCC (IVI Valencia)



LCC: longitud cráneo caudal

1.1.1.3 Estriol no conjugado (uE3):

El uE₃ es un metabolito del estriol (hormona estrogénica producida por la unidad fetoplacentaria), que no ha sido conjugado por el hígado materno (el 90% sufre gluco o sulfoconjugación). Sus valores están bajos en la trisomía 21, durante toda la gestación, debido a la hipoplasia suprarrenal que presentan estos fetos, la cual reduce la producción de sulfato de dehidroepiandrosterona que el hígado fetal hidroxila y la placenta metaboliza a estriol¹².

1.1.1.4 Inhibina A:

La inhibina A es una glicoproteína producida en su mayor parte por el sincitiotrofoblasto y en menor proporción por el cuerpo lúteo³⁵. Está compuesta por dos subunidades, la subunidad alfa y la beta pudiendo ser esta última beta A o beta B. La inhibina A (formada por la subunidad alfa y la beta A) y la inhibina B (formada por la subunidad alfa y la beta B) se sintetizan en las gónadas y regulan la secreción de la FSH³⁶.

Su papel en el embarazo no está claro, puede incluir la supresión de la producción de FSH y con ello impedir la ovulación durante el embarazo así como su efecto en la embriogénesis y el desarrollo fetal por vía de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) para regular la síntesis y secreción de hCG en la placenta³⁷.

Los factores de corrección son los mismos que para los otros marcadores.

Los niveles de inhibina A comienzan a aumentar en el primer trimestre hasta las 11 semanas^{17, 18}. Permaneciendo estables entre las 15 y 25 semanas para elevarse a partir de la semana 25 y alcanzar su pico máximo al término. En los embarazos con síndrome de Down los valores en sangre materna se encuentran aumentados en el segundo trimestre respecto a gestaciones euploides aunque se desconoce la razón y cuál es su papel en la gestación normal³⁸.

El cribado del segundo trimestre mediante el triple test (AFP, uE3, hCG) tiene una sensibilidad de un 71,3% con una tasa de falsos positivos (TFP) de un 5%³⁹. El uso de la inhibina A en el cribado del segundo trimestre fue sugerida en primer lugar por Van Lith *et al*¹⁵. Varios estudios apoyan que la incorporación de la inhibina A al cribado del segundo trimestre constituyendo el cuádruple test (AFP, uE3, hCG e inhibina A) puede mejorar la sensibilidad a un 77,5% manteniendo la TFP en un 5%³⁹. Aunque algunos autores defienden la incorporación de la inhibina A en cribado del segundo trimestre⁴⁰, esto no está protocolizado en la mayoría de países ya que no existen grandes series de trabajos que muestren los resultados en términos de sensibilidad y TFP de la realización del cuádruple test.

En el primer trimestre su valoración no agregaría mayores beneficios.

Su uso es controvertido debido a la gran variabilidad existente entre distintos lotes de los reactivos, que en muchos casos es mayor del 10-15%, lo que implica que únicamente puede ser utilizada por laboratorios que manejen un gran volumen de cribados que les permitan ajustar frecuentemente las medianas⁷.

1.1.1.5 Proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A):

La PAPP-A es una macroglucoproteína producida por el trofoblasto que se detecta en sangre materna tras la implantación⁴¹ y está codificada por un gen situado en el brazo largo del cromosoma 9⁴². Se trata de una proteína insulin-like growth factor binding protein (IGFBP). Existe una correlación directa entre el peso placentario y los niveles séricos de PAPP-A. En el suero materno la PAPP-A forma un complejo conectado con la proteína básica mayor de los eosinófilos.

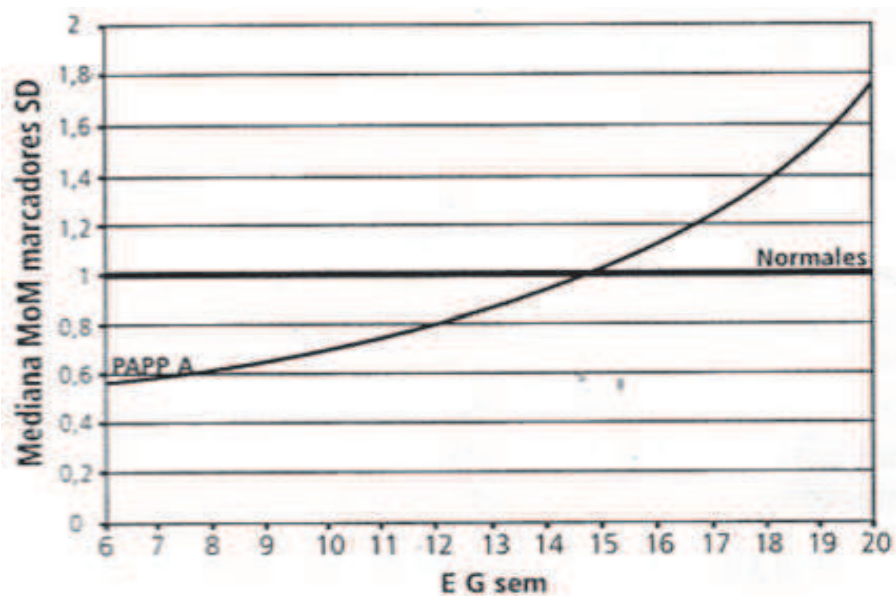
Varios estudios que se llevaron a cabo en la década de los noventa^{14, 43, 44} demuestran que las concentraciones de PAPP-A se encuentran disminuidas en fetos afectados de cromosopatías, pero que la desviación de la normalidad va disminuyendo según avanza la

gestación, por lo que es especialmente útil en el primer trimestre (Figura 5).

En la figura 6 aparecen representados los niveles de PAPP-A en función de la LCC.

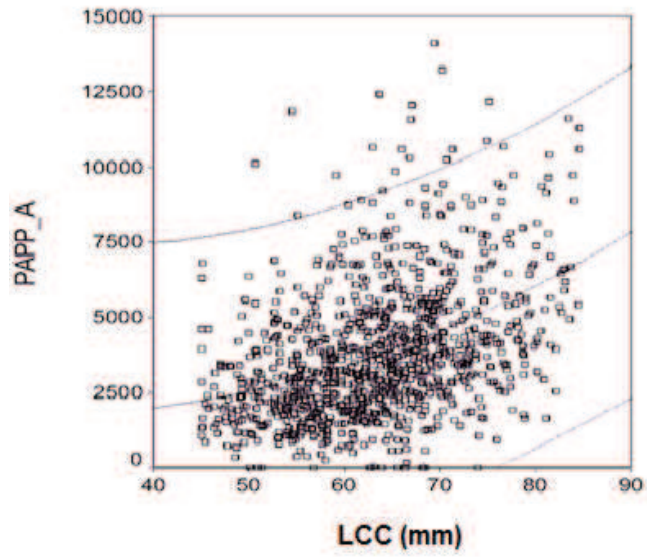
Se desconoce la razón de los bajos niveles observados en la trisomía 21, pero es probable que esté relacionada con la insuficiencia placentaria como sucede en las gestaciones no viables^{14, 45}.

Figura 5: Evolución de la mediana de los MoM para la PAPP-A entre las 6 y 20 semanas de gestación.



SD: síndrome de Down; EG: edad gestacional
Spencer, K. et al (2002)³¹

Figura 6. Niveles de PAPP-A en función de la LCC (IVI, Valencia)



PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo
LCC: longitud cráneo caudal

1.1.2 Marcadores ecográficos:

1.1.2.1 Translucencia nuchal (TN)

La TN es la representación ecográfica de la colección de líquido existente bajo la piel en la nuca del feto en el primer trimestre del embarazo.

Este término se usa independientemente de si tiene o no tabiques, o de si se sitúa únicamente detrás del cuello o envuelve todo el cuerpo del feto².

Consiste en una acumulación fisiológica de fluido que procede del sistema linfático paracervical. Se ha observado que un aumento en esta colección líquida se relaciona con una mayor prevalencia de aneuploidías y otros defectos congénitos, y se considera, sin duda alguna, el marcador más temprano y sensible para detectar anomalías cromosómicas^{2, 46}. Se desconoce el mecanismo fisiopatológico que explica el engrosamiento de la TN, pero parece que podría estar relacionado con una cardiopatía subyacente (frecuente en fetos aneuploides), con alteraciones hemodinámicas tempranas o un retraso en el desarrollo del sistema de drenaje linfático cervical. La TN es un fenómeno transitorio, que aparece de forma temprana alrededor de las semanas 9-10 de embarazo y tiende a desaparecer conforme progresa

la gestación, independientemente del cariotipo fetal. El tamaño de la TN se correlaciona con la gravedad de la anomalía cromosómica.

La edad óptima para medir la TN es entre las semanas 11-13⁴⁶. La LCC mínima debe ser de 45 mm y la máxima de 84 mm.

Los motivos por los que se han determinado las 11 semanas como edad más precoz para medirla son principalmente dos: por una parte que el cribado necesita disponer de test diagnósticos, y una biopsia corial antes de esta edad gestacional se asocia con deficiencias en los miembros fetales y por otra parte que muchas anomalías fetales mayores se pueden diagnosticar por ecografía a partir de la semana 11 de gestación.

Los motivos para elegir las 13⁴⁶ semanas como límite superior son poder proporcionar a las mujeres con fetos afectados la opción de abortar en el primer trimestre en lugar del segundo y además el hecho de que en los fetos anormales la incidencia de TN aumentada disminuye tras la semana 13 de gestación y las probabilidades de obtener esta medida disminuyen tras la semana 13 puesto que el feto adopta una posición vertical que dificulta obtener la imagen adecuada².

La medición debe obtenerse ampliando la imagen de manera que el polo cefálico ocupe un 75% de la pantalla del ecógrafo⁴⁶. Se debe obtener un corte sagital medio del feto y este debe estar en una posición

neutral, con la cabeza en línea con la columna. Cuando el cuello está hiperextendido la medida se encuentra erróneamente aumentada y cuando el cuello está flexionado aparece reducida. Hay que distinguir entre la piel fetal y el amnios y se debe medir la parte más ancha de la TN (Figuras 7, 8 y 9).

Figura 7. Translucencia nual (Fetal Medicine Foundation)



Quando se magnifica la imagen (antes o después de congelar) es importante reducir la ganancia. Esto evita el fallo de poner el calíper en un extremo borroso de la línea que infraestima la medida de la TN.

Figura 8. Medición de la TN: colocación de los calipers (IVI, Valencia)

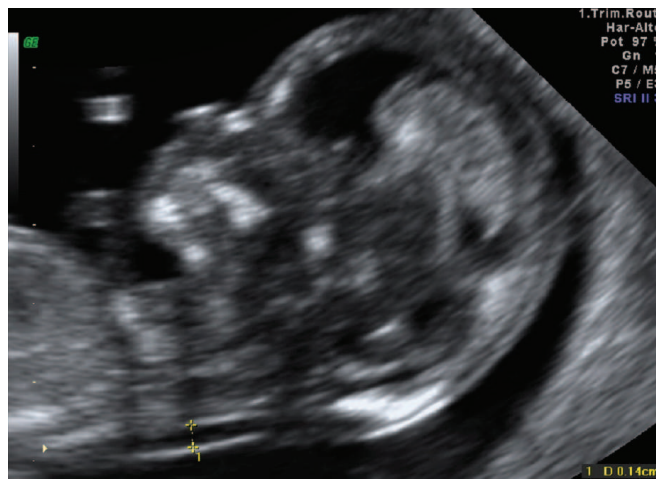


Figura 9. TN aumentada (IVI, Valencia)



El grosor de la TN en fetos euploides aumenta con la LCC.

En un 75-80% de los fetos con trisomía 21 el grosor de la TN está sobre el percentil 95 del rango de la normalidad y no hay relación entre el grosor de la TN y la edad materna. Es por esto que la edad materna se puede combinar con la TN fetal para proporcionar un cribado eficaz de defectos cromosómicos en el primer trimestre.

Para cada LCC las medidas de la TN representan un coeficiente de probabilidad que se multiplica por el riesgo a priori basado en edad materna y gestacional para calcular el nuevo riesgo. Cuanto mayor es la TN, mayor es el coeficiente de probabilidad y por tanto mayor es el nuevo riesgo².

1.1.2.2 Otros marcadores ecográficos

Además de la TN se han descrito otros marcadores ecográficos de cromosopatías muy sensibles y específicos durante el primer trimestre. Estos son: la ausencia de hueso nasal, el aumento de la resistencia al flujo en el *ductus* venoso y la regurgitación tricuspídea. La proporción de fetos con trisomía 21 y ausencia de hueso nasal se sitúa en el 60-70%, pero sólo en el 2,5% de fetos con cromosomas sanos. Se halla flujo anormal en el *ductus* en alrededor del 66% de los fetos afectados de síndrome de Down y únicamente en el 3% de fetos sanos. La

regurgitación tricuspídea se encuentra en un 65% de los fetos con trisomía 21 y en el 1% de fetos euploides⁴⁷⁻⁵⁴.

La incorporación de estos marcadores al cribado del primer trimestre supone una mejora en la realización del cribado con un incremento en la tasa de detección de un 93% a un 96% y una disminución en la TFP al 2,5%⁵²⁻⁵⁴.

1.2 Cribado combinado

1.2.1- Segundo trimestre

El cribado puede realizarse en el segundo trimestre basado en la combinación de marcadores como: la edad materna, la hCG, la AFP y el uE3, o en el primer trimestre utilizando la combinación de la edad materna, la TN, f β -hCG, y PAPP-A^{3, 18, 55-57}.

A finales de los años ochenta, se introdujo el cribado bioquímico del segundo trimestre que tenía en cuenta no sólo la edad materna sino también la concentración de varios productos feto-placentarios en la circulación materna.

A las 16 semanas de gestación, la mediana de las concentraciones séricas maternas de AFP, uE3, hCG (total y fracción β libre) e inhibina A en embarazos con trisomía 21 difieren de los valores normales de manera que permiten el uso de combinaciones de algunas

o todas estas sustancias en la selección de un grupo de “alto riesgo”. Este método de cribado es más efectivo que el que tiene en cuenta únicamente la edad materna y con una misma tasa de técnicas invasivas (alrededor del 5%), puede identificar al 50–70% de los fetos con trisomía 21².

La asociación entre los valores séricos elevados de hCG y bajos de AFP y el síndrome de Down constituían el doble test^{30, 58,59}.

El tercer marcador introducido en el cribado del segundo trimestre fue el uE3, cuyos niveles eran más bajos en gestaciones afectas de aneuploidias. Esta combinación da lugar al triple test^{7, 60}.

La inhibina A es el marcador más recientemente incorporado al cribado del segundo trimestre, ya que se encontró significativamente elevado en gestaciones con trisomía 21^{15, 61}. Con la incorporación de este último marcador se constituye el cuádruple test (AFP, hCG, uE₃, inhibina A)⁶¹.

El cribado del segundo trimestre que se realiza entre las semanas 15 y 19⁶² mediante la combinación de la edad materna y de hCG, AFP, uE3 e Inhibina A ha demostrado tener una tasa de detección de aproximadamente un 56-71% con una TFP de un 5%⁶³, mientras que con el cribado del primer trimestre mediante la combinación de edad materna, TN fetal, β -hCG libre y PAPP-A, se ha observado una tasa de

detección cercana al 90% con una TFP igual o menor a la anterior (3-5%)^{5, 50}.

1.2.2 Primer trimestre

La prueba combinada del primer trimestre que utiliza dos marcadores bioquímicos (β -hCG y PAPP-A) y uno ecográfico (TN) puede considerarse el iniciador de una nueva etapa dentro de la historia del cribado prenatal de las aneuploidías, ya que aparte de realizar un salto cuantitativo importante en la capacidad de detección, respecto a los mejores resultados del cribado bioquímico del segundo trimestre, aumentando entre 15-30 puntos porcentuales la sensibilidad para una misma tasa de falsos positivos. Introduce dos conceptos nuevos en las estrategias de cribado: la combinación de marcadores bioquímicos con marcadores ecográficos y su valoración simultánea o secuencial dependiendo de la cronología en la determinación.

Los valores de los marcadores bioquímicos varían con el tiempo de gestación y, en casos determinados, con factores maternos o del propio embarazo (covariables). Así, la concentración de los marcadores bioquímicos en suero materno, además de modificarse con la edad gestacional, también varían específicamente con el peso materno^{64, 65}. Cuando los precursores son de origen materno, la influencia del peso de

la madre es pequeña, como en el caso del uE₃, mientras que sucede todo lo contrario para la PAPP-A, donde el peso materno es decisivo. Así, una adecuada corrección para el peso materno debe tener en cuenta todos estos factores, deberá aplicarse en primer lugar, y será diferente para cada marcador⁷. Otras covariables que influyen en las medidas de los marcadores bioquímicos son: la máquina y los reactivos empleados, la edad gestacional, la raza⁶⁶, el hábito tabáquico⁶⁷, la diabetes tipo I, y quizá el modo de concepción^{2,7}. Hay otros factores en estudio como posibles covariables que pueden influir en el cribado del primer trimestre como el sexo fetal⁶⁸.

Es necesario realizar ajustes a las medidas de β -hCG libre y PAPP-A para el cálculo correcto del riesgo específico para cada paciente. De este modo, se convierte cada medida en un múltiplo de la mediana esperada (MoM), específica para un embarazo de la misma edad gestacional, peso materno, raza, hábito tabáquico y quizá método de concepción, y en gestaciones gemelares la corionicidad⁶⁹. Por ejemplo, en mujeres de raza negra la PAPP-A es un 60% mayor que en las de raza blanca, por lo que si no tuviéramos en cuenta la raza infravaloraríamos significativamente el riesgo de trisomía 21 en las mujeres de raza negra².

En el desarrollo de los algoritmos para el cribado combinado del primer trimestre, para que la estimación del riesgo para cada paciente sea lo mas exacta posible es necesario realizar ciertos ajustes en las medidas de la PAPP-A y la β -hCG teniendo en cuenta su asociación con la edad gestacional, peso materno, la raza, la edad materna y el tabaquismo^{65,70}. Si se debe ajustar por el tipo de concepción (natural vs TRA) es un tema de actual discusión.

El ajuste consiste básicamente en convertir cada medida en MoM específicos para una gestante con igual edad gestacional, peso, hábito tabáquico y raza. Se asume que los MoM para cada marcador bioquímico en gestaciones no afectas de trisomía 21 siguen una distribución Gaussiana, especificada en términos de media, desviación típica y correlaciones.

1.3 Marcadores del síndrome de Down y técnicas de reproducción asistida (TRA)

La búsqueda de la gestación en edades cada vez más avanzadas y la introducción de las TRA, en la mayoría de los países desarrollados, ha aumentado el número de gestantes por encima de los 35 años⁷¹. En la actualidad, un 20% aproximadamente de las

embarazadas tienen > 35 años. Este grupo incluye un 50% de los fetos con trisomía 21⁷².

Por otro lado, si bien la prevalencia de infertilidad es de 1-15%⁷³,⁷⁴ en la población general, ésta también aumenta con la edad materna.

El cribado del síndrome de Down en el grupo de mujeres gestantes mediante TRA es más complicado que en el grupo de gestantes que conciben de manera natural por varios motivos. Entre ellos se encuentra el hecho de que la proporción de gestantes con 35 años o más en este grupo es mayor, lo que comporta mayor riesgo de tener un hijo afecto de una anomalía cromosómica, especialmente de síndrome de Down⁷⁵⁻⁷⁷. Además determinados aspectos en el grupo de pacientes con problemas reproductivos como por ejemplo la existencia de abortos espontáneos recurrentes y defectos en la gametogénesis se han asociado con anomalías cromosómicas⁷⁸⁻⁸². Algunos estudios describen un aumento de la incidencia de cromosomopatías en el grupo de parejas que han tenido un embarazo tras un tratamiento de infertilidad de hasta un 10-20% respecto a < 1% en la población general⁷⁹. Otros estudios muestran un aumento de la incidencia de alteraciones cromosómicas en gestaciones obtenidas tras TRA concretamente en el subgrupo de ICSI^{83,84, 85 77, 86}.

Por otra parte, los embarazos conseguidos tras TRA suelen ser gestaciones de mayor riesgo obstétrico ya que existe en este grupo mayor tasa de gestaciones múltiples^{57, 77} y de complicaciones maternas y fetales como preeclampsia, parto prematuro, anomalías congénitas, retraso del crecimiento, y bajo peso al nacimiento, tanto en únicas como múltiples^{6, 87-89}.

Estos aspectos, unidos al hecho de que normalmente estas pacientes prefieren evitar una técnica de diagnóstico invasiva (amniocentesis o BVC) por el riesgo de aborto, hacen que el cribado combinado del primer trimestre cobre una especial importancia en este grupo.

En el cribado del segundo trimestre, existen datos que muestran una modificación en los niveles séricos de β -hCG, AFP y uE3 en gestaciones obtenidas tras TRA, lo que conlleva un aumento de falsos positivos^{18, 90-94}. Existen datos contradictorios sobre el efecto de las TRA sobre el cribado del primer trimestre.

1.3.1 Efecto de las TRA en los marcadores ecográficos del cribado del primer trimestre

La medida del grosor de la TN, que es el marcador aislado (junto con la edad) más efectivo como test de cribado, es el que menos se afecta por el tipo de concepción. Si se realiza adecuadamente la estimación del riesgo utilizando un test de cribado que incluya solamente la edad y la TN detecta hasta un 75-80% de fetos afectados de síndrome de Down con una TFP de un 3-5%⁹⁵. Existen varios trabajos que han investigado la posible influencia de las TRA sobre el grosor de la TN.

Algunos autores han descrito grosores de la TN ligeramente diferentes en embarazos obtenidos con TRA. El grupo de Amor *et al* (2009)⁶ observa un discreto aumento del grosor de la TN en el grupo de TRA respecto a gestaciones espontáneas sin encontrar diferencias entre FIV e ICSI. En el estudio de Gjerris *et al* (2009)⁵ la media de la TN en el grupo de TRA resultó ser menor que en el grupo de gestaciones naturales; obteniendo también diferencias en cuanto al grosor de la TN en el grupo de FIV vs ICSI, siendo menor la TN en el grupo de FIV, e incluso describen diferencias según los tipos de tratamiento: TN menor en gestaciones tratadas con protocolo largo vs aquellas tratadas con protocolo corto. Aunque es posible que estos resultados se deban a los múltiples análisis estadísticos realizados, ya que en principio no parece

haber una explicación biológica que lo justifique. Otros autores⁹⁶ encuentran una pequeña disminución en la TN en el grupo de FIV respecto a controles, pero en el grupo de TRA en global la distribución de los valores de la TN es comparable con el grupo de gestaciones naturales.

La mayoría de estudios no encuentran diferencias, en el tamaño de la TN entre gestaciones obtenidas por TRA y naturales^{18, 97-102} no influyendo por tanto este parámetro de manera significativa en la realización del cribado y en la TFP^{18, 55, 56, 97, 101-105}.

El cribado del primer trimestre que combina edad materna, TN, β -hCG y PAPP-A permite una tasa de detección del 90% con una TFP del 5%^{50, 106-108}. La inclusión de nuevos marcadores ecográficos ha permitido mejorar el cribado obteniendo una mejor tasa de detección y disminuyendo la TFP. Estos marcadores que son la ausencia de hueso nasal, el aumento de la resistencia al flujo en el *ductus* venoso y la regurgitación tricuspídea son observados en el 60,65,55% de fetos con síndrome de Down y en el 2.6, 3.2, y 0.9% de fetos euploides respectivamente. La incorporación de estos marcadores al cribado del primer trimestre permite aumentar la tasa de detección a un 93-96% con una TFP del 2.5%. El cribado del síndrome de Down a partir de la edad materna, la TN y alguno de estos marcadores: *ductus venosus*, hueso

nasal o regurgitación tricuspídea para un punto de corte de 1:100 permite identificar un 83, 85, y 85% de casos con una TFP de 2.9,2.7 y 2.7% respectivamente⁹⁵. No hay hasta ahora estudios sobre estos marcadores en gestaciones obtenidas por TRA.

1.3.2 Efecto de las TRA en los marcadores bioquímicos del cribado del primer trimestre

En gestaciones afectas de síndrome de Down se ha visto que los valores de β -hCG se encuentran aumentados hasta el doble respecto a gestaciones espontáneas¹⁰⁹ y los valores de PAPP-A disminuidos en la mitad, según algunos estudios¹⁴.

Los valores séricos maternos de PAPP-A y β -hCG pueden verse afectados por diferentes variables por lo que para estimar el riesgo individual para cada paciente, el cribado del primer trimestre debe ser ajustado por edad, peso, raza, tabaquismo y la maquina utilizada para el análisis. Estudios previos han analizado el método de concepción como otra covariable que influye en el cribado del primer trimestre afectando los niveles de PAPP-A y β -hCG (Tabla 3). Existen además varios factores de confusión, ya que mujeres sometidas a TRA suelen padecer con mayor frecuencia alteraciones endocrinológicas, metabólicas o genéticas que pueden influir en los parámetros bioquímicos del cribado y

por otro lado existen múltiples tipos de tratamiento hormonal, diferentes modos de TRA así como la posibilidad de transferir embriones frescos o congelados.

Tabla 3. Comparación de los marcadores bioquímicos del primer trimestre en gestaciones únicas concebidas mediante TRA respecto a gestaciones espontáneas en estudios previos

| TRA (Cribado 1er trimestre) | Gestaciones naturales | Gestaciones TRA | PAPP-A | β-hCG |
|--|-----------------------|--|------------------|------------------|
| Liao <i>et al</i> (2001) ⁹⁷ | 1233 | FIV 220 ICSI 30 EO 161 | ↓ ↓ ↔ | ↑ ↔ ↔ |
| Wojdemann <i>et al</i> (2001) ⁹⁹ | 3026 | FIV 47 EO 63 | ↔ ↔ | ↔ ↔ |
| Niemimma <i>et al</i> (2001) ⁹⁸ | 4265 | FIV 49 | ↑ | ↔ |
| Orlandi <i>et al</i> (2002) ¹⁰⁰ | 370 | FIV 32 ICSI 42 | ↓ ↔ | ↔ ↔ |
| Maymon and Shulman (2002) ¹¹⁰ | 285 | FIV 71 | ↓ | ↔ |
| Lai <i>et al</i> (2003) ¹¹¹ | 3059 | IO 49 | ↑ | ↔ |
| Ghisoni L <i>et al</i> (2003) ¹⁰¹ | 426 | FIV 50 ICSI 92 | ↔ ↔ | ↑ ↑ |
| Maymon and Shulman (2004) ¹¹² | 1781 | FIV 99 | ↓ | N/A |
| Bersinger <i>et al</i> (2004) ³ | 156 | 79 IVF 17 FET | ↓ ↔ | ↔ ↔ |
| Hui <i>et al</i> (2005) ¹¹³ | 401 | FIV 92 ICSI 57 FET/FIV 54 FET/ICSI 31 | ↓ ↓ ↔ ↓ | ↓ ↔ ↔ ↔ |

| | | | | |
|--|--------|---|-----------------------|-----------------------|
| Bellver J <i>et al</i> (2005) ⁵⁶ | 498 | FIV 47 ICSI 222 EO 97 OD/FIV 71 OD/ICSI 119 | ↔ ↔ ↔ ↔ ↔ | ↔ ↔ ↔ ↔ ↑ |
| Tul and Novak-Antolic (2006) ¹⁰⁴ | 914 | FIV 130 ICSI 54 | ↓ ↓ | ↔ ↔ |
| Lambert-Messerlian <i>et al</i> (2006) ¹⁸ | 37070 | IA 570 FIV 277 | ↓ ↔ | ↔ ↔ |
| Kagan <i>et al</i> (2008) ¹¹⁴ | 97 294 | FIV 2115 | ↓ | ↑ |
| Anckaert E. (2008) ⁵⁵ | 4088 | FIV 59 ICSI 163 FET 31 | ↓ ↓ ↔ | ↔ ↔ ↔ |
| Gjerris AC. (2009) ⁵ | 2543 | FIV 516 ICSI 400 FET 84 | ↓ ↓ ↔ | ↔ ↔ ↔ |
| Amor DJ. (2009) ⁶ | 50253 | FIV 654 ICSI 1052 GIFT 33 | ↓ ↓ ↓ | ↔ ↔ ↔ |
| Engels <i>et al</i> (2010) ⁹⁶ | 1164 | FIV 203 ICSI 192 | ↓ ↓ | ↓ ↔ |
| Bender <i>et al</i> (2010) ¹⁰⁵ | 1431 | FIV 110 ICSI 331 | ↓ ↓ | ↑ ↑ |
| Matilainen <i>et al</i> (2011) ¹⁰² | 24 783 | FIV/ICSI 176 FET 87 HRT-FET 19 | ↑ ↔ ↔ | ↔ ↔ ↔ |

EO: estimulación ovárica; IA: inseminación artificial; GIFT: transferencia intratubárica de gametos; FET: transferencia de embriones congelados (ciclo no estimulado); HRT- FET: transferencia de embriones congelados (ciclo estimulado)

↑ Aumenta; ↓ Disminuye; ↔ No se han observado diferencias

Estudios previos demuestran diferencias en los marcadores bioquímicos del cribado del segundo trimestre que conllevan un aumento en la TFP en estas pacientes^{90, 91, 115}.

La mayoría de los estudios más recientes muestran también diferencias en los marcadores séricos del primer trimestre en gestaciones obtenidas por TRA respecto a gestaciones naturales.

Algunos de estos trabajos han mostrado especialmente una disminución en los niveles de PAPP-A en el grupo de TRA de manera global respecto a gestaciones espontáneas^{3, 5, 6, 55, 97, 100, 104, 112, 113}. Esta disminución también se ha observado en algunos subgrupos como inseminación intrauterina con inducción de la ovulación¹⁸, FIV^{5, 6, 96, 97, 104, 105} o ICSI^{5, 6, 55, 96, 105}. Sin embargo existen trabajos que no encuentran diferencias en los valores séricos de PAPP-A en embarazos tras TRA respecto a controles^{18, 56, 101}.

El mayor estudio realizado hasta el momento (*Kagan et al* 2008)¹¹⁴, muestra una disminución del 10% en los niveles de PAPP-A en gestaciones tras TRA (n=2115) cuando se compara con gestaciones naturales (n=94 688).

Amor et al (2009)⁶ investiga las concentraciones de PAPP-A en gestaciones obtenidas por reproducción asistida con transferencia de embriones frescos (n=773) comparado con el grupo de embriones

congelados (n= 573). Cuando compara ambos grupos con gestaciones espontáneas, los niveles de PAPP-A están reducidos en ambos. Pero estos se encuentran significativamente disminuidos en el grupo de embriones frescos cuando se comparan directamente con el grupo de congelados.

Matilainen *et al* (2011)¹⁰² no encuentra diferencias significativas entre el grupo de gestaciones naturales, transferencia de embriones frescos y de congelados respectivamente. Otros estudios no encuentran disminución significativa en los niveles de PAPP-A en embarazos obtenidos con transferencia de embriones congelados^{5, 55}. El estudio de Hui *et al* (2005)¹¹³ muestra que los niveles de PAPP-A son significativamente menores en gestaciones obtenidas por ICSI tanto en el grupo de embriones frescos como congelados y en el grupo de FIV con embriones frescos comparado con controles. Otros trabajos con menores tamaños muestrales no encuentran diferencias en los niveles de PAPP-A en el subgrupo de TRA con embriones congelados^{5, 55}.

En cuanto a las concentraciones de β -hCG en gestaciones por TRA los resultados son más contradictorios. Aunque algunos estudios e incluso uno de los trabajos previos muestra una ligera disminución en el grupo de FIV⁹⁶ la mayoría de trabajos no encuentran diferencias^{5, 6, 56,}

100, 102, 104

El hallazgo del aumento de la β -hCG y la disminución significativa de la PAPP-A en el grupo de TRA conllevaría un aumento en el riesgo de tener un falso positivo en el cribado combinado del primer trimestre con lo que aumenta la posibilidad de tener que llevar a cabo una prueba invasiva (BVC o amniocentesis) en estas pacientes. Con los datos que existen hasta ahora, si no se realiza un ajuste en las concentraciones de PAPP-A y de β -hCG en gestaciones por TRA, la TFP puede ser de hasta un 9-11% mayor según algunos estudios incluso tras ajustar por edad materna^{5, 6, 96}. Kagan *et al* (2008) que encuentra una disminución en la PAPP-A de un 10% y un aumento en la β -hCG de un 9% en TRA vs gestaciones naturales, muestra como consecuencia un aumento en la TFP del 4.6% (grupo control) al 7.6% (TRA). Existen por el contrario algunos estudios que no encuentran diferencias en la TFP en el cribado del primer trimestre en el grupo de TRA^{56, 97, 99, 116} por lo que son necesarios más estudios para aclarar estos resultados.

1.3.3 Posibles teorías sobre las diferencias en los marcadores bioquímicos en gestaciones obtenidas mediante TRA

Se han propuesto diferentes teorías sobre la diferencia en los valores séricos de los marcadores bioquímicos del primer trimestre en el grupo de TRA respecto a embarazos espontáneos.

1.3.3.1 Infertilidad

Existen características propias de las gestaciones obtenidas por reproducción asistida que pueden constituir factores de confusión, llevando a resultados contradictorios en cuanto a los niveles séricos de la PAPP-A y la β -hCG. Por un lado la existencia de infertilidad y sus diferentes causas en estas pacientes puede comportar una diferente distribución en los marcadores bioquímicos así como la existencia de problemas metabólicos o genéticos⁹¹.

Algunos autores sugieren que los niveles más bajos de PAPP-A en este grupo puedan ser el resultado de alteraciones metabólicas debidas a la infertilidad materna¹¹⁰. Sin embargo también hay contradicciones a este respecto. Amor *et al* (2009)⁶ encuentra una disminución en los niveles de PAPP-A tanto en aquellas gestaciones en las que existe un factor de infertilidad masculino como en las que hay factor femenino y en aquellas en las que se dan ambos. También habla de una aumento en los niveles de β -hCG en el grupo de embarazos en

los que no hay factor masculino de infertilidad comparado con aquellos en los que sí lo hay y con gestaciones naturales. Anckaert *et al* (2008), no encuentra diferencias en los niveles de PAPP-A cuando existe causa masculina de infertilidad respecto a causa femenina. Sin embargo en este mismo trabajo se muestra un aumento en los niveles de β -hCG en el grupo en el que no existe factor masculino comparado con el grupo en el que sí hay un factor masculino de infertilidad y con gestaciones naturales.

Existe un estudio¹¹⁷ que explora si los cambios observados en los marcadores se deben a la disminución de la fertilidad en sí misma o a las TRA utilizadas. En este estudio se comparan gestaciones espontáneas con un periodo de tiempo de búsqueda de gestación largo ($25 \geq$ meses) con gestaciones naturales con un tiempo normal hasta la concepción (0-12 meses) que es el grupo de referencia y otro grupo de gestaciones obtenidas por FIV, analizando los marcadores bioquímicos del cribado del primer trimestre en cada grupo. Los resultados son similares en el grupo de mujeres subfértiles (tiempo de gestación ≥ 25 meses) y el grupo de FIV, encontrando una disminución significativa en la PAPP-A comparado con el grupo control. No se observaron diferencias en los niveles de β -hCG entre los diferentes grupos. Los autores de este trabajo, a la luz de estos resultados, proponen la

subfertilidad más que las TRA en sí mismas como causa posible de las diferencias en los niveles de PAPP-A.

1.3.3.2 Múltiples cuerpos lúteos y lugares de implantación

También se ha propuesto como causa del incremento o disminución de los niveles de los marcadores la existencia de múltiples cuerpos lúteos y lugares de implantación⁵⁷.

1.3.3.3 Complicaciones obstétricas

Por otro lado, también se ha propuesto que un retraso funcional en el desarrollo de la placenta y el feto y el aumento del riesgo de complicaciones obstétricas en las gestaciones con TRA, puede conllevar cambios en los marcadores bioquímicos^{87-89, 112, 113}. Algunos estudios muestran que los niveles más bajos de PAPP-A en el primer trimestre indican alteraciones relativas a la placenta, como restricción del crecimiento intrauterino, bajo peso al nacimiento, o preeclampsia¹¹⁸⁻¹²¹. Estas complicaciones maternas y/o fetales ocurren con mayor frecuencia en gestaciones obtenidas por TRA^{6, 87-89}. Por otro lado el grupo de Amor *et al* (2009)⁶ encuentra una disminución en los niveles de PAPP-A en el grupo de TRA independientemente de si existieron o no complicaciones obstétricas (como preeclampsia o bajo peso al nacimiento). En el trabajo de Zhong *et al* (2011)¹²² se encuentra que las gestaciones obtenidas por TRA con niveles bajos de PAPP-A tienen un

riesgo aumentado de tener fetos pequeños para la edad gestacional o parto pretérmino (<32 semanas) cuando se comparan con gestaciones espontáneas con niveles bajos de PAPP-A. Todo esto indica que las alteraciones de las concentraciones séricas de los marcadores bioquímicos en gestaciones por TRA podrían constituir un indicador de una anormal invasión trofoblástica¹⁰⁵.

1.3.3.4 **Vanishing twin**

Varios estudios han descrito otro factor que puede tener impacto en los marcadores del cribado del primer trimestre; la existencia de un gemelo evanescente (*vanishing twin*). El estudio de *Spencer et al* (2010)¹²³ no encuentra diferencias en los valores de PAPP-A y de β -hCG en mujeres con un segundo saco gestacional vacío en el primer trimestre respecto a gestaciones naturales únicas. Sin embargo revela un aumento significativo en los niveles de PAPP-A en embarazos con un *vanishing twin* en el que ha sido posible medir la LCC. No se observaron cambios en los niveles de β -hCG. El estudio de *Amor et al* (2009)⁶ encuentra una tendencia al aumento en los niveles de PAPP-A en el grupo de gestaciones de TRA con un *vanishing twin*, asociado con la existencia de más de un latido fetal al principio de la gestación. Otros autores no encuentran diferencias en el grupo de gestaciones con un *vanishing twin* en los valores de β -hCG y de PAPP-A¹²⁴. Por lo tanto,

según algunos autores, la existencia de un *vanishing twin* no parece disminuir los valores de PAPP-A si no que de hecho parece aumentarlos⁶.

1.3.3.5 Momento de la realización del test bioquímico

Otra posible teoría propuesta para explicar la reducción en los niveles de PAPP-A en gestaciones concebidas por TRA puede ser un artefacto debido a haber realizado el test en un momento más temprano en la gestación¹¹⁰. Aunque otros autores como Amor et al (2009)⁶ no encuentran diferencias en el tiempo de realización de la ecografía o la extracción sanguínea en embarazos con TRA o sin TRA. Sin embargo sí encuentran un ligero aumento en la LCC en subgrupo de TRA con embriones congelados comparado con embriones frescos. Esta diferencia puede deberse al mayor tiempo de cultivo *in vitro* en el caso de los embriones congelados, aunque esta diferencia no afecta a los niveles de PAPP-A ya que estos se ajustan por edad gestacional.

1.3.3.6 Estimulación hormonal

La razón más defendida por la mayoría de estudios, que explicaría por qué los niveles de PAPP-A están disminuidos en gestaciones por TRA es la influencia de un tratamiento hormonal exógeno^{3, 6, 104, 113}. El trabajo de Amor et al (2009)⁶ que estudia el posible efecto del tratamiento hormonal en los marcadores del cribado, compara

un grupo de gestaciones obtenidas por TRA con embriones frescos frente a embriones congelados sin tratamiento hormonal encontrando una disminución en los niveles de PAPP-A en los ciclos en los que se había utilizado algún tratamiento hormonal frente a los que no. También muestra, que ésta diferencia en la PAPP-A era independiente del tipo de estimulación ovárica que se hubiera llevado a cabo. Este autor sugiere que la administración de hormonas exógenas puede interferir con los cambios endocrinológicos normales del principio de la gestación resultando en una disminución de los niveles de PAPP-A. El trabajo de Matilainen *et al* (2011)¹⁰² también encuentra una disminución en los niveles de PAPP-A en gestaciones mediante FIV/ICSI que han recibido tratamiento hormonal. Pero no encuentra diferencias significativas entre el grupo de TRA con transferencia de congelados frente a gestaciones espontáneas.

Los resultados del estudio de Tul and Novak-Antolic (2006)¹⁰⁴ muestran una disminución significativa en los niveles de PAPP-A cuando se incrementa el número de embriones transferidos o el número de ovocitos obtenidos mediante punción. Estos autores proponen como hipótesis para justificar estos hallazgos: el número de ovocitos obtenidos reflejan el número de cuerpos lúteos en la gestación, que por tanto aumentarían la secreción de inhibina A, producida por los mismos,

disminuyendo por tanto los valores de PAPP-A. Lo que sugiere que la inhibina A inhibe la secreción de PAPP-A. Bender *et al* (2010)¹⁰⁵ por el contrario no encuentra correlación entre las concentraciones de PAPP-A y β -hCG y la transferencia de uno, dos o tres embriones respectivamente en gestaciones por TRA.

2 HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis de trabajo es que las TRA no influyen en los parámetros ecográficos y bioquímicos del cribado de primer trimestre del síndrome de Down.

3 OBJETIVOS

3.1 Principal:

Analizar si existen diferencias en los marcadores del cribado del primer trimestre del síndrome de Down en gestaciones obtenidas por TRA respecto a gestaciones naturales.

3.2 Secundarios:

1. Analizar la influencia potencial de diversos factores relacionados con las TRA sobre las principales variables del cribado del primer trimestre (TN, β -hCG libre, PAPP-A y TFP): etiología de la infertilidad, modalidad de TRA, ovodonación, congelación de embriones, protocolos de estimulación ovárica, el diagnóstico genético preimplantacional (DGP) y la embriorreducción espontánea (*vanishing twin*).
2. Establecer la necesidad y el modo de ajustar el cribado de primer trimestre de síndrome de Down en TRA.

4 PACIENTES Y MÉTODO

4.1 Diseño

Estudio analítico retrospectivo de cohortes realizado en la Unidad de Medicina Materno-Fetal del Instituto Universitario IVI de Valencia; entre el 1 de enero del 2000 y el 31 de diciembre del 2010.

4.2 Pacientes

4.2.1- Población estudiada

Se analizan los datos correspondientes a 4053 mujeres de raza caucásica, con gestaciones únicas y fetos sanos, que acudieron a la Unidad de Medicina Materno Fetal del Instituto universitario IVI de Valencia. De ellas, 2042 correspondían a embarazos obtenidos tras TRA (casos) y 2011 a embarazos de concepción natural (controles). Se analizaron los datos de los marcadores del cribado del primer trimestre de todas ellas entre las semanas 11 y 13+6 de gestación: a 628 (15,5%), se les realizó en la semana 11 a 2493 (61,5%) en la semana 12 y a 932 (23%) en la semana 13.

4.2.2- Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión:

Gestaciones únicas con fetos euploides sin malformaciones estructurales, bien demostrado por análisis cromosómico durante el embarazo o bien por exploración normal al

nacimiento, a los que se les ha realizado cribado combinado del primer trimestre en nuestro centro.

Criterios de exclusión:

- a. Gestaciones únicas con malformaciones estructurales fetales o con anomalías cromosómicas
- b. Gestaciones múltiples
- c. Gestaciones obtenidas con TRA donde los embriones transferidos derivaban de dos procedimientos diferentes (FIV e ICSI) y no se podía establecer cuál de ellos había implantado.

4.3 Método

4.3.1 Grupos a estudio según el modo de concepción

La población fue dividida en grupos de acuerdo al modo de concepción (Tabla 4).

- concepción natural (n=2011)
- inseminación artificial (IA) (n=350) siendo con semen propio (IAH) (n=246) o de donante (IAD) (n=104)
- FIV (n=328)
- ICSI (n=1364)

A su vez, los casos de FIV/ICSI fueron subdivididos teniendo en cuenta si los embriones transferidos fueron frescos (n=1432) o

congelados (n=260) y si los ovocitos fueron propios (n=1086) o donados (n=606).

En las gestaciones obtenidas por transferencia de dos o más embriones, se comprobó si los embriones transferidos provenían sólo de FIV, sólo de ICSI, o de ambas técnicas (FIV/ICSI). Cuando provenían sólo de una técnica concreta, se incluyeron en el estudio asignándolos al grupo correspondiente (FIV o ICSI). Sin embargo se excluyeron del estudio aquellos casos en los que los embriones transferidos provenían de ambos procedimientos (FIV/ICSI), con intención de valorar el efecto de la FIV y de la ICSI de forma independiente.

En la tabla 4 se encuentran representados los tamaños muestrales (n) de los diferentes grupos en función del tipo de concepción.

Tabla 4. Grupos a estudio según el tipo de concepción

| 4053 casos | | | | |
|-------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------|---------------------|
| Natural n=2011 | Reproducción asistida n=2042 | | | |
| | IA n=350 | FIV/ICSI n=1692 | | |
| | IAH n=246 IAD n=104 | | Frescos n=1432 | Congelados n=260 |
| | | FIV (n=328) Propios Donados | n=95 n=185* | n=34 n=14* |
| | | ICSI (n=1364) Propios Donados | n=805 n=347* | n=152 n=60* |

* ovodonación (n=606)

IA: inseminación artificial; IAH: inseminación artificial homóloga; IAD: inseminación artificial de donante; FIV: fecundación in vitro; ICSI: intracytoplasmic sperm injection

Los embarazos naturales son aquellos que se concibieron de forma espontánea, sin mediación de TRA .

Los obtenidos mediante TRA se consiguieron por alguno de los siguientes métodos:

4.3.1.1 Inseminación artificial (IA):

Introducción de espermatozoides de una forma no natural en la cavidad uterina de la mujer en su periodo ovulatorio con el objetivo de lograr una gestación. Dependiendo del origen del semen puede ser homóloga o de donante. En todos los casos la IA se realizó tras inducción de la ovulación con gonadoropinas.

Tras la IA se realiza soporte en fase lútea con progesterona natural micronizada vía vaginal a una dosis de 200mg/24h.

4.3.1.2 Fecundación in vitro (FIV)

La FIV es una TRA que consiste en la fecundación del ovocito en condiciones de cultivo *in vitro*, previa obtención y preparación de los gametos, para posteriormente transferir los embriones a la cavidad uterina.

4.3.1.3 Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

La ICSI es una técnica que consiste en la microinyección de un espermatozoide en el interior de un ovocito previamente decumulado.

En ciclos de FIV e ICSI con ovocitos propios se realiza apoyo de fase lútea con progesterona micronizada de 200 mg/12 horas vía vaginal.

4.3.1.4 Ovodonación

Es la TRA en la que los óvulos de una mujer donante son utilizados con la finalidad de generar embriones y dar lugar a una gestación en una mujer receptora con algún problema de esterilidad como: edad reproductiva avanzada, alteraciones genéticas, fallo ovárico prematuro, pacientes que han recibido tratamiento gonadotóxico, fallos repetidos en TRA...etc. En los ciclos realizados con ovodonación se realiza preparación endometrial con estrógenos exógenos y se inicia la administración de progesterona micronizada vaginal u oral el día de la donación a razón de 400 mg/12 horas.

4.3.1.5 Transferencia de embriones congelados

Consiste en la transferencia de embriones que habían permanecido congelados tras su obtención en un ciclo de recuperación de ovocitos previo. Los ciclos realizados con transferencia de embriones congelados no llevan estimulación hormonal con gonadotropinas y pueden ser realizados empleando estrógenos como sustitución hormonal o sin ellos (ciclo natural).

A todas las pacientes que acudieron a la Unidad de Medicina Materno-Fetal del Instituto Universitario IVI Valencia en este período de tiempo se les realizó, entre las 11⁺⁰ y 13⁺⁶ semanas de gestación (45-84mm de LCC), un cribado de aneuploidías basado en la combinación de la edad materna, TN y las concentraciones séricas de β -hCG y PAPP-A tras firma de un consentimiento informado. La extracción de sangre para el análisis bioquímico y la ecografía se realizaron el mismo día. El cribado combinado del primer trimestre se realizó siguiendo las guías de la Fetal Medicine Foundation: (<http://www.fetalmedicine.com/fmf/online-education/01-11-136-week-scan/>)

La TN fetal fue medida mediante ecografía transabdominal o transcervical por seis ecografistas expertos certificados por la FMF siguiendo los criterios de medición de ésta:

- periodo gestacional entre las 11 y 13⁺⁶
- LCC entre 45 y 84 mm
- magnificación de la imagen hasta que la cabeza fetal y el tórax ocupen toda la pantalla
- obtención de un corte sagital de la cara, definido por la presencia de la punta de la nariz y la forma rectangular del

paladar anteriormente, el diencéfalo en el centro y la membrana nuchal posteriormente.

- el feto debe estar en una posición neutra, con la cabeza alineada con la columna.
- se debe distinguir la piel del amnios
- la medida de la TN se toma de la zona más gruesa colocando los cálipers encima de la línea que define el grosor de la translucencia nuchal.

También se realizó un estudio de la anatomía fetal evaluando: cráneo, encéfalo, cara, cuello, columna vertebral, tórax, abdomen, y miembros para descartar malformaciones fetales tempranas y fueron seguidas hasta la finalización del embarazo excluyendo en todos los casos anomalías anatómicas y cromosómicas.

Las concentraciones séricas de β -hCG libre y PAPP-A se midieron utilizando el sistema de análisis KRYPTOR (desde el 16 de Junio del 2000 hasta el 1 de Julio del 2004) o con el analizador AutoDelfia (desde el 2 de Julio del 2004 en adelante) en un laboratorio de referencia (Laboratorios Echevarne, Barcelona, Spain; ISO 9001:2000). Al no encontrar diferencias significativas en las tasas de falsos positivos del cribado de aneuploidías realizado con ambas

técnicas de laboratorio, se analizó toda la muestra conjuntamente, a semejanza de lo que han realizado otros grupos^{5,77}.

Los niveles séricos de β -hCG y PAPP-A se expresaron como MoM tras ajustar por peso materno. Para el cálculo de las MoM, se utilizaron los parámetros bioquímicos del laboratorio de referencia derivados de una base de datos de 3586 gestaciones únicas concebidas de manera natural.

Se utilizó la ecuación de regresión ($\log_{10}NT = -0.3599 + 0.0127CRL - 0.000058CRL^2$) publicada por el grupo de la Fetal Medicine Foundation (Nicolaidis, 1998)¹²⁵ para el cálculo de las MoM del valor de la TN en función de la LCC. De este modo, se ajustan los valores de la TN según la edad gestacional en la que se realizó dicha medición¹²⁵.

El programa utilizado para la estimación del riesgo del síndrome de Down fue el programa SSD 4.1 (SBP software, Barcelona, Spain) hasta el 15 Marzo 2006 y el programa de la Fetal Medicine Foundation (Astraia GmbH, München, Germany) a partir de dicha fecha.

El cribado fue considerado positivo cuando el riesgo resultó mayor de 1/250, ofreciendo a estas pacientes una técnica de diagnóstico invasiva (amniocentesis o BVC).

En los embarazos obtenidos tras ovodonación la edad basal considerada para el riesgo estimado fue la edad de la donante en el momento de la extracción ovocitaria.

En gestaciones obtenidas por transferencia de embriones congelados la edad materna considerada fue la que dicha paciente tenía en el momento de la congelación embrionaria.

4.3.2 Variables de estudio

Para evaluar la influencia de las TRA sobre los parámetros del cribado de aneuploidías en las 11-13 semanas (TN, PAPP-A y β -hCG libre, expresados en forma de MoM), se analizaron las siguientes variables:

4.3.2.1 Resultado del cribado de aneuploidías

- MoM de la TN
- MoM del PAPP-A
- MoM de la β -hCG libre
- tasa de resultados falsos positivos

4.3.2.2 Datos epidemiológicos:

- edad de la paciente (años)
- índice de masa corporal (IMC) (Kg/m^2)
- longitud cráneo caudal (LCC) en el momento del cribado
- edad gestacional en el momento del cribado

4.3.2.3 Causa de esterilidad:

- femenina
- masculina
- mixta (causa masculina y femenina en la misma pareja)

4.3.2.4 Tipo de concepción:

- natural
- TRA:
 - técnica: IA, FIV ó ICSI
 - origen de los ovocitos: propios u ovodonación
 - tipo de embriones: frescos o congelados

4.3.2.5 Parámetros clínicos y de laboratorio

4.3.2.5.1 Protocolo de estimulación ovárica

- *Protocolo largo con agonistas de la GnRH:*

Consiste en inducir la supresión hipofisaria con un agonista de la GnRH con el fin de evitar el reclutamiento precoz de los folículos antrales. Se inicia la administración del agonista de la GnRH desde el día 21-22 del ciclo anterior .La dosis inicial es de 0,1mg/día o equivalente en función del análogo usado. Se realiza ecografía en la menstruación para comprobar el reposo ovárico (folículos < 10mm) y a partir de entonces se

disminuye la dosis de agonista a la mitad, y se inicia la estimulación con la administración de gonadotropinas. Se realiza monitorización ecográfica del crecimiento folicular periódica a partir del cuarto a sexto día de estimulación con periodicidad posterior de 2-3 días. Cuando los folículos llegan a un tamaño de unos 17-18mm se desencadena la ovulación mediante 6500 UI de hCG-r. Se programa la punción a las 36 horas después de desencadenarse la ovulación y se da soporte con progesterona vaginal a dosis de 200mg/12 horas.

- *Protocolo corto con antagonistas de la GnRH:*

Consiste en utilizar un antagonista de la GnRH que produce una supresión hipofisaria profunda e inmediata, evitando el pico prematuro de hormona luteinizante.

Se realiza ecografía con la menstruación (2º-3º día) para confirmar el reposo ovárico. Se inicia la administración de gonadotropinas a dosis adecuadas según las características de la paciente (entre 100-300 UI normalmente). Tras 4 o 5 días de estimulación se

inician controles ecográficos del desarrollo folicular, así como monitorización de los niveles de estradiol séricos cada 2-3 días estrechando los controles cada 24 horas, en caso necesario, a medida que nos acercamos al periodo periovulatorio. Con folículos de 14 mm se añade una dosis de antagonista (0,25mg) diaria. Con folículos de unos 18-19 mm de diámetro medio se recomienda desencadenar la ovulación mediante 6500 UI de HCG-r realizando la captación ovocitaria a las 36 horas de haberse desencadenado la ovulación. Se administra progesterona vaginal a dosis de 200mg/12 horas como soporte de fase lútea.

4.3.2.5.2 Dosis y tipo de gonadotropinas administradas:

FSH, LH, hMG y otras.

4.3.2.5.3 Diagnóstico genético preimplantacional (DGP):

El DGP es el diagnóstico de anomalías cromosómicas ó genéticas en embriones generados mediante TRA antes de su implantación, para lograr que los hijos nazcan libres de éstas enfermedades.

Los embriones son estudiados en el laboratorio, permitiendo la diferenciación entre embriones sanos y afectados, y la transferencia en el

útero solamente de los primeros. Esta técnica requiere siempre un tratamiento de reproducción asistida ICSI, para disponer de los embriones en el laboratorio.

4.3.2.6 Embriorreducción (*vanishing*)

Concepto que hace referencia a la existencia de dos sacos gestacionales con embrión y latido al inicio de la gestación deteniéndose uno de los dos precozmente y de manera espontánea en el primer trimestre, antes de las 12 semanas. Continuando el seguimiento como gestaciones únicas. Nos referimos sólo a los casos de embriorreducción espontánea excluyendo los casos de embriorreducción yatrógena.

4.3.3 Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico con el programa Statistical Package for Social Sciences versión 19 (SPSS, Chicago, IL, USA). Los datos han sido representados como las medias y proporciones con el correspondiente intervalo de confianza del 95%.

Se utilizaron Pruebas de Chi cuadrado para la comparación de proporciones, y tests de la T de Student o Análisis de varianza (seguido de el test post-hoc de Bonferroni, en los casos de comparaciones con más de dos categorías) para detectar diferencias estadísticas entre proporciones o medias en diferentes grupos respectivamente, Se consideró diferencia estadísticamente significativa cuando se halló un p-valor $<0,05$.

Los datos se presentan con las proporciones o las medias de cada variable y sus correspondientes intervalos de confianza.

5 RESULTADOS

5.1 Población a estudio

Los datos descriptivos de la población a estudio están representados en la tabla 5. Se muestran las características basales del grupo control (2011 gestaciones naturales) y de la población a estudio (2042 embarazos obtenidos con técnicas de reproducción asistida) en función del tipo de concepción y el tamaño muestral (n) de cada grupo

Según los datos del estudio observamos que la edad materna es significativamente más baja en gestaciones naturales respecto a aquellas concebidas tras reproducción asistida (media, IC 95%: 33,10 (32,56 - 33,64) vs 35,95 (35,33 - 36,57). Hay que tener en cuenta que la edad de la paciente en el grupo de ovodón hace referencia a la edad de la receptora. La edad media de las donantes en este grupo fue 26,5 (26,2-26,9) (IC 95%).

Tabla 5. Características basales de la población a estudio

| Tipo de concepción | n | Edad (años) | Edad gestacional (semanas) | LCC (mm) | IMC |
|----------------------|------|--|----------------------------|------------------------|--|
| Natural | 2011 | 33,10 (32,56-33,64) | 12,11 (12,08-12,14) | 65,30 (64,91-65,69) | 23,50 (22,97-24,03) |
| TRA (total) | 2042 | 35,95^a (35,33-36,57) | 12,05 (12,02-12,07) | 64,63 (64,30-64,96) | 24,10 (23,57-24,63) |
| IA (total) | 350 | 36,34 (35,84-36,84) | 12,00 (11,94-12,06) | 65,24 (64,44-66,05) | 24,13 (23,72-24,54) |
| Embriones frescos | 1432 | 36,36 (35,61-37,11) | 12,07 (12,04-12,10) | 64,45 (64,04-64,85) | 24,14 (23,53-24,75) |
| FIV (propios) | 95 | 33,80 (33,16-34,44) | 12,11 (11,98-12,24) | 64,78 (63,02-66,54) | 23,67 (22,97-24,37) |
| ICSI (propios) | 805 | 34,50 (34,25-34,75) | 12,07 (12,03-12,11) | 64,35 (63,82-64,88) | 23,90 (23,64-24,16) |
| FIV (donados) | 185 | 40,10^{a,b} (39,43-40,77) | 12,04 (11,95-12,13) | 64,08 (62,80-65,36) | 24,40 (23,85-24,95) |
| ICSI (donados) | 347 | 39,70^{a,b} (39,24-40,16) | 12,08 (12,02-12,15) | 64,92 (64,10-65,74) | 24,56^a (24,12-25,00) |
| Embriones Congelados | 260 | 36,25 (35,71-36,79) | 11,97 (11,91-12,04) | 64,76 (63,90-65,62) | 24,10 (23,62-24,58) |
| FIV (propios) | 34 | 34,36 (33,05-35,67) | 11,96 (11,88-12,05) | 64,97 (62,53-67,43) | 22,92 (21,64-24,20) |
| ICSI (propios) | 152 | 34,39^a (33,77-35,01) | 11,97 (11,88-12,07) | 65,14 (63,86-66,42) | 23,94 (23,20-24,68) |
| FIV (donados) | 14 | 37,00^{a,b} (35,70-38,30) | 11,90 (11,70-12,09) | 65,05 (62,57-67,54) | 26,35^a (24,47-28,23) |
| ICSI (donados) | 60 | 40,30^{a,b} (39,02-41,58) | 12,00 (11,86-12,14) | 64,03 (62,32-65,74) | 25,30^a (24,70-25,90) |

Datos expresados como media e IC 95%; ^a: Datos estadísticamente significativos comparados con naturales; $p < 0,05$; ^b: Datos estadísticamente significativos comparados con ovocitos propios; TRA: técnicas de reproducción asistida; IA: inseminación artificial; FIV: fecundación in vitro; ICSI: intracytoplasmic sperm injection; LCC: longitud craneo caudal; IMC: índice de masa corporal

No existen diferencias en cuanto a la edad entre el grupo de IA y FIV/ICSI ni con embriones frescos ni congelados (teniendo cuenta estos dos grupos en global). Sin embargo, sí observamos diferencias en cuanto a la edad media entre el grupo de TRA y embarazos naturales. Las pacientes pertenecientes a los grupos en los que se realizaron ciclos con ovocitos donados la edad media de la receptora es mayor frente a aquellas en las que se utilizaron ovocitos propios y esta diferencia se observa tanto con embriones frescos como congelados siendo estadísticamente significativa (Tabla 5).

Los grupos de pacientes a las que se les realizaron ciclos con ovocitos donados tenían un IMC superior respecto a las que habían conseguido gestación de manera natural siendo esta diferencia estadísticamente significativa en todos los grupos excepto en el grupo de FIV con embriones frescos. Pese a que en receptoras el IMC es superior al resto de grupos, está en rango de normalidad el valor medio y en un solo grupo (FIV con embriones congelados) en rango de sobrepeso leve; luego a pesar de un mayor IMC en estos grupos éste no es realmente patológico ni tiene porqué influir en los resultados que además vienen ajustados por peso materno.

5.2 Resultados según el tipo de concepción

Uno de los objetivos del estudio es determinar si el tipo de técnica de reproducción asistida utilizada influye en los marcadores del cribado del primer trimestre.

5.2.1. Gestaciones obtenidas tras TRA vs gestaciones naturales

Antes de considerar los distintos tipos de TRA realizamos una comparación teniendo en cuenta el total de gestaciones conseguidas por reproducción asistida de manera que cuando comparamos las 2011 pacientes que gestaron de manera natural con el grupo a estudio (TRA) de 2042, no se observan diferencias significativas en la TN.

Los valores de β -hCG resultan significativamente mayores en el grupo de TRA y los valores de PAPP-A significativamente menores en este grupo respecto al control aunque sin una repercusión significativa en la tasa de falsos positivos. Datos que aparecen representados en la tabla 6.

Tabla 6. Comparación de los marcadores del cribado del primer trimestre entre el grupo a estudio (TRA) y el grupo control (gestaciones naturales)

| Modo de concepción | TN (MoM) | β-hCG (MoM) | PAPP-A (MoM) | TFP % |
|---------------------------|---------------------|---|---|--------------------|
| Controles (n=2011) | 0,98 (0,96-0,99) | 1,07 (1,03-1,11) | 1,07 (1,02-1,11) | 5,2 (4,23-6,17) |
| TRA (n=2042) | 0,97 (0,96-0,98) | 1,17^a (1,12-1,21) | 0,97^a (0,93-1,01) | 5,2 (4,28-6,12) |

Datos expresados como media IC 95%

^a *Datos estadísticamente significativos comparados con naturales: p<0,05*

TN: translucencia nucal; β -hCG; fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; TFP: tasa de falsos positivos; TRA: técnicas de reproducción asistida

El grupo a estudio de pacientes gestantes con alguna técnica de reproducción asistida fue dividido en diferentes subgrupos según el tipo de técnica utilizada: más simple, IA, o más compleja (FIV/ICSI). A su vez, el grupo de FIV/ICSI se dividió en varios grupos en función del tipo de embriones transferidos (frescos vs congelados) y del origen de los ovocitos (propios o donados). El objetivo fue estudiar si existían diferencias en los marcadores del primer trimestre y en la tasa de falsos positivos en función del tipo de TRA. Los resultados se exponen a continuación.

5.2.2. Gestaciones obtenidas tras IA vs gestaciones naturales

Los valores de los marcadores del cribado del primer trimestre, expresados como múltiplos de la mediana y representados como media e intervalo de confianza al 95%, en las pacientes que se sometieron a un ciclo de IA (homóloga o de donante) están representados en la tabla 7. Realizamos un análisis comparativo entre estos datos y el grupo control obteniendo los siguientes resultados.

En cuanto a la TN no hubo diferencias significativas ni en valores absolutos ni en MoM en ninguna de las comparaciones realizadas entre los subgrupos mencionados y embarazos espontáneos ($p > 0,05$) (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados de los parámetros del cribado del primer trimestre en gestaciones obtenidas con TRA (FIV/ICSI) atendiendo a al tipo de técnica utilizada (embriones frescos)

| Modo de concepción | TN (MoM) | β-hCG (MoM) | PAPP-A (MoM) | TFP % |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| Controles (n=2011) | 0,98 (0,96-0,99) | 1,07 (1,03-1,11) | 1,07 (1,02-1,11) | 5,2 (4,23-6,17) |
| IA (todos) (n=350) | 0,97 (0,94-1,00) | 1,04 (0,96-1,13) | 1,09 (0,98-1,20) | 5,1 (2,80-7,40) |
| IAH (n=246) | 0,96 (0,93-0,99) | 1,09 (0,99-1,2) | 1,03 (0,90-1,16) | 4,9 (2,22-7,58) |
| IAD (n=104) | 1,00 (0,93-1,07) | 0,93 (0,78-1,07) | 1,24 (1,04-1,45) | 5,8 (1,3-10,3) |

Datos expresados como media IC 95%

TN: translucencia nucal; β-hCG; fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; TFP: tasa de falsos positivos; TRA: técnicas de reproducción asistida

No se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables en el grupo de inseminación artificial comparado con naturales ni cuando la inseminación se realizó con semen homólogo ni de donante.

5.2.3. Gestaciones obtenidas tras FIV o ICSI vs gestaciones naturales

Previo a comparar los distintos subgrupos teniendo en cuenta todas las variables mencionadas hemos analizado sólo los grupos de técnicas de reproducción asistida más complejas (FIV e ICSI). En total se recogen los datos de 328 pacientes de FIV y de 1364 pacientes de ICSI respectivamente comparándolas con el grupo control con el objeto de determinar si existen diferencias en los marcadores del cribado del primer trimestre.

Observamos que las concentraciones de β -hCG son significativamente más altas en ambos grupos comparados con gestaciones naturales y la PAPP-A aparece además significativamente más baja en embarazos obtenidos por ICSI comparado con el grupo control. En ambos grupos sin repercusión sobre la tasa de falsos positivos (Tabla 8). No se encontraron diferencias en los valores de la TN (MoM).

Tabla 8. Resultado marcadores del primer trimestre en FIV, ICSI y controles

| Modo de Concepción | TN (MoM) | β -hCG (MoM) | PAPP-A (MoM) | TFP % |
|--------------------|---------------------|---|---|--------------------|
| Controles (n=2011) | 0,98 (0,96-0,99) | 1,07 (1,03-1,11) | 1,07 (1,02-1,11) | 5,2 (4,23-6,17) |
| FIV (n=328) | 0,92 (0,89-0,95) | 1,30^a (1,15-1,45) | 1,05 (0,93-1,17) | 3,9 (1,6-6,2) |
| ICSI (n=1364) | 0,97 (0,95-0,99) | 1,21^a (1,15-1,27) | 0,92^a (0,88-0,97) | 6,9 (3,9-9,9) |

Datos expresados como media IC 95%

^a: Datos estadísticamente significativos comparados con controles: $p < 0,05$

TN: translucencia nucal; β -hCG; fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; TFP: tasa de falsos positivos; FIV: fecundación in vitro; ICSI: intracytoplasmic sperm injection

Cuando se consideraron las gestaciones obtenidas por inseminación artificial y aquellas por FIV/ICSI por separado sólo se observaron las diferencias en los marcadores bioquímicos descritas anteriormente en el grupo de FIV/ICSI comparado con el control.

5.2.4. Gestaciones obtenidas tras FIV o ICSI teniendo en cuenta la congelación embrionaria y si los ovocitos fueron propios o donados.

Los valores de los marcadores del cribado del primer trimestre, expresados como múltiplos de la mediana y representados como media e intervalo de confianza al 95%, en las pacientes que se sometieron a un ciclo de FIV o ICSI con embriones frescos están representados en la tabla 9 y con embriones congelados en la tabla 10. Realizamos un análisis comparativo entre estos datos y el grupo control obteniendo los siguientes resultados.

En cuanto a la TN no hubo diferencias significativas en ninguna de las comparaciones realizadas entre los subgrupos mencionados y embarazos espontáneos (Tablas 9 y 10).

Tabla 9. Resultados de los marcadores del cribado del primer trimestre, en gestaciones obtenidas con TRA atendiendo al tipo de técnica utilizada (FIV/ICSI), con embriones frescos.

| Modo de concepción | TN (MoM) | β -hCG (MoM) | PAPP-A (MoM) | TFP % |
|---------------------------------|---------------------|---|---|---|
| Controles (n=2011) | 0,98 (0,96-0,99) | 1,07 (1,03-1,11) | 1,07 (1,02-1,11) | 5,2 (4,23-6,17) |
| Embriones Frescos (n=1432) | 0,96 (0,95-0,98) | 1,21 (1,16-1,26) | 0,95 (0,91-1,00) | 6,1 (4,90-7,30) |
| Ovocitos propios | 0,97 (0,95-0,99) | 1,15 (1,09-1,21) | 0,88^a (0,83-0,93) | 7,6 (5,93-9,27) |
| (FIV) (n=95) | 0,91 (0,83-0,98) | 1,07 (0,87-1,27) | 0,91 (0,74-1,07) | 6,3 (1,44-11,16) |
| (ICSI) (n=805) | 0,98 (0,96-1,00) | 1,18 (1,11-1,25) | 0,89^a (0,83-0,93) | 8,3^a (6,40-10,20) |
| Ovocitos donados | 0,94 (0,92-0,97) | 1,31^a (1,21-1,41) | 1,07 (0,98-1,15) | 3,4 (1,90-4,90) |
| FIV (n=185) | 0,93 (0,90-0,96) | 1,40^a (1,21-1,59) | 1,11 (0,95-1,26) | 2,6 (0,35-4,85) |
| ICSI (n=347) | 0,95 (0,92-0,98) | 1,28^a (1,17-1,39) | 1,03 (0,93-1,12) | 3,7 (1,73-5,67) |

Datos expresados como media e IC 95%

^a: Datos estadísticamente significativos comparados con el grupo control

TN: translucencia nucal; β -hCG; fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; TFP: tasa de falsos positivos; FIV: fecundación in vitro; ICSI: intracytoplasmic sperm injection

Tabla 10. Resultados de los marcadores del cribado del primer trimestre, en gestaciones obtenidas con TRA atendiendo a al tipo de técnica utilizada (FIV/ICSI), con embriones congelados.

| Modo de concepción | TN (MoM) | β -hCG (MoM) | PAPP-A (MoM) | TFP % |
|------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Controles (n=2011) | 0,98 (0,96-0,99) | 1,07 (1,03-1,11) | 1,07 (1,02-1,11) | 5,2 (4,23-6,17) |
| Embriones Congelados (n=260) | 1,02 (0,97-1,06) | 1,11 (1,00-1,21) | 0,92 (0,82-1,02) | 5,1 (2,66-7,54) |
| Ovocitos propios | 1,03 (0,96-1,09) | 1,08 (0,95-1,21) | 0,94 (0,81-1,08) | 6,7 (2,75-10,65) |
| (FIV) (n=34) | 0,93 (0,85-1,01) | 1,09 (0,80-1,39) | 1,16 (0,79-1,53) | 0,00 (0,00-0,00) |
| (ICSI) (n=152) | 1,05 (0,98-1,12) | 1,07 (0,93-1,22) | 0,89 (0,75-1,03) | 8,2 (3,7-12,67) |
| Ovocitos donados | 1,00 (0,94-1,07) | 1,19 (0,99-1,39) | 0,91 (0,74-1,10) | 1,9 (0,00-4,54) |
| FIV (n=14) | 1,04 (0,96-1,12) | 1,09 (0,83-1,36) | 0,87 (0,61-1,13) | 2,4 (0,00-7,08) |
| ICSI (n=60) | 0,97 (0,88-1,07) | 1,27 (0,97-1,57) | 0,95 (0,68-1,20) | 1,7 (0,00-4,97) |

Datos expresados como media e IC 95%

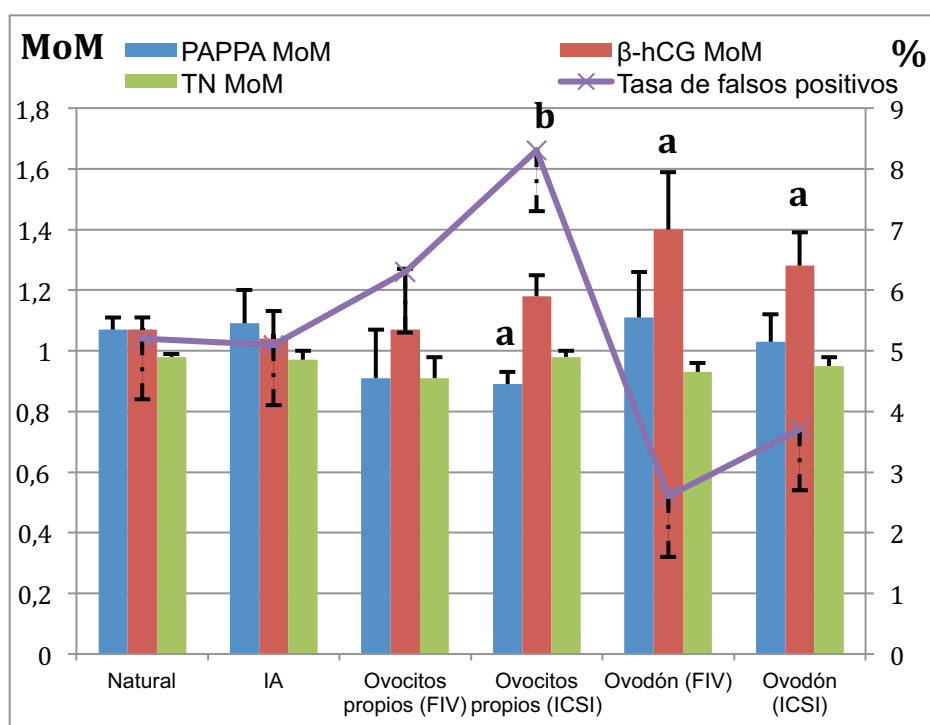
TN: translucencia nucal; β -hCG; fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo ; TFP: tasa de falsos positivos; FIV: fecundación in vitro; ICSI: intracytoplasmic sperm injection

Sin embargo, tal y como podemos ver en la tabla 9, los niveles de β -hCG (MoM) fueron significativamente mayores en el grupo de ovodón tanto en FIV como en ICSI y los de PAPP-A (MoM) significativamente menores en el grupo de gestaciones obtenidas por reproducción asistida con ovocitos propios en ICSI respecto a las gestaciones naturales (Tabla 9). Sólo en el grupo de ICSI con ovocitos propios y embriones frescos existió una reducción en los niveles de PAPP-A (MoM) con un incremento en la TFP estadísticamente significativa.

Los niveles de β -hCG (MoM) se encontraron aumentados sólo en el grupo de ciclos de FIV/ICSI con ovocitos donados, pero sin observarse influencia significativa en la TFP.

En la figura 10 se muestra un resumen de todos los datos expuestos anteriormente.

Figura 10. Comparación de los valores de PAPP-A, β -hCG y TN (MoM) entre gestaciones únicas espontáneas y aquellas obtenidas mediante diferentes técnicas de reproducción asistida utilizando embriones frescos.



TN: translucencia nucal; β -hCG; fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; TFP: tasa de falsos positivos; FIV: fecundación in vitro; ICSI: intracytoplasmic sperm injection; a: valores en MoM estadísticamente significativos ($p < 0,05$) respecto a gestaciones naturales; b: TFP estadísticamente significativa respecto a gestaciones naturales ($p < 0,05$)

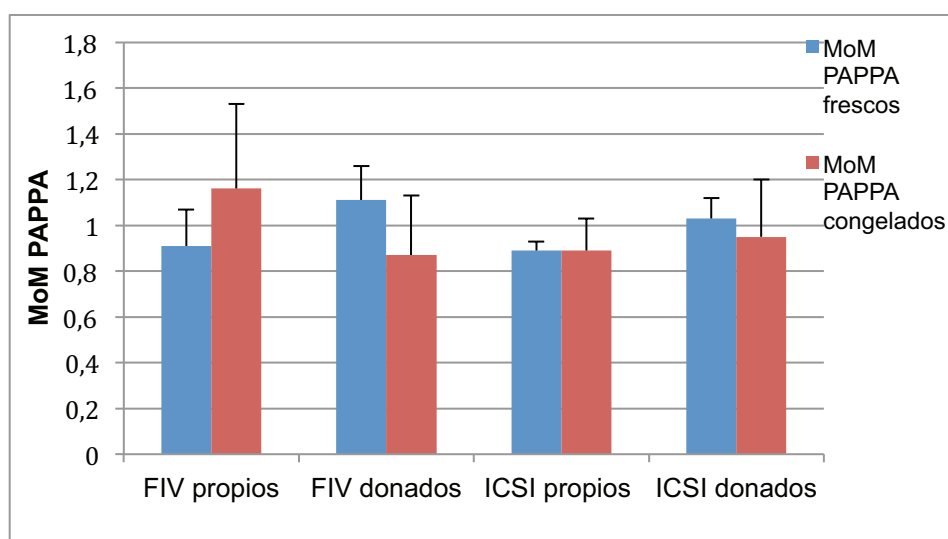
Para analizar si el efecto de la congelación de los embriones influía en las variables bioquímicas del primer trimestre que estamos estudiando, comparamos el grupo de gestaciones obtenidas tras

transferencia de embriones frescos con congelados y este último grupo con naturales.

Los valores de las variables expresados como media e intervalo de confianza aparecen reflejadas en la tabla 10.

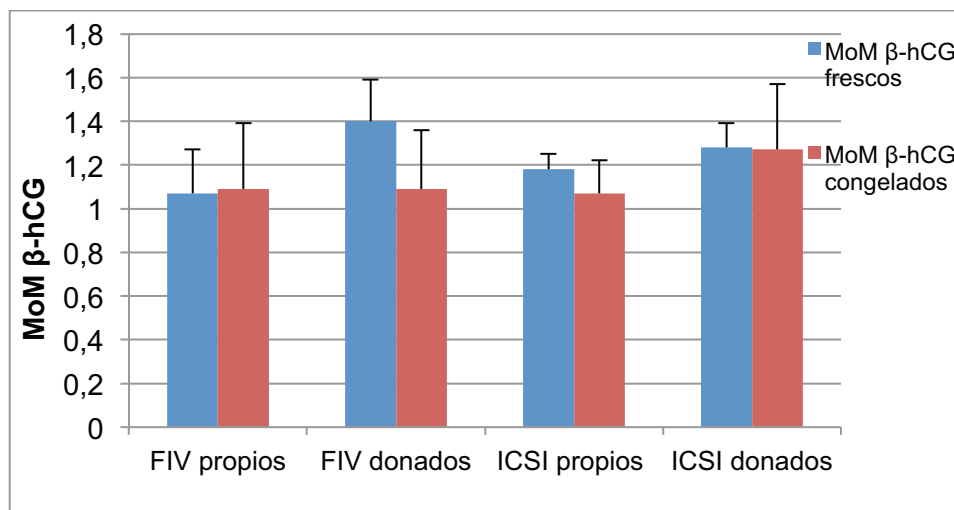
Al comparar ciclos de FIV/ICSI con embriones frescos y congelados respectivamente, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la TN, la β -hCG (MoM) y la PAPP-A (MoM) (Tabla 10 y figuras 11 y 12).

Figura 11. Comparación de los valores de PAPP-A entre el grupo de embriones frescos y congelados



PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; FIV: fecundación in vitro; ICSI: intracytoplasmic sperm injection

Figura 12. Comparación de los valores de β -hCG entre el grupo de embriones frescos y congelados



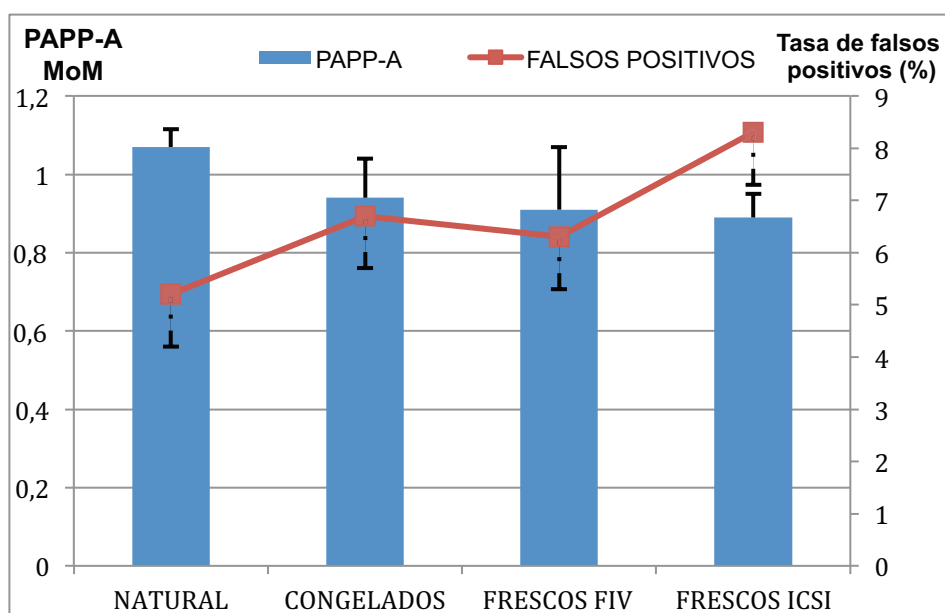
β -hCG; fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana; FIV: fecundación in vitro; ICSI: intracytoplasmic sperm injection

Sin embargo se observa que los valores de PAPP-A (MoM) tienden a ser más bajos y la TFP más alta en el grupo de ICSI con ovocitos propios y embriones congelados cuando se comparan con naturales (aunque sin alcanzar significación estadística) (Tabla 10 y Figura 13).

En la figura 13 se muestra gráficamente la tendencia al descenso en los valores de PAPP-A en los distintos grupos según el tipo de concepción desde la más simple (embarazos espontáneos) hasta la técnica más compleja (ICSI, embriones frescos). Se observa en este gráfico además cómo aumenta la tasa de falsos positivos y en

los distintos grupos siendo más marcadas estas diferencias cuanto más compleja es la técnica de fecundación, resultando significativo el descenso de la PAPP-A y el aumento de la tasa de falsos positivos en el grupo de ICSI con embriones frescos y ovocitos propios respecto a aquellas gestaciones obtenidas por FIV en comparación con gestaciones naturales.

Figura 13. Tendencia de los niveles séricos de PAPP-A y la TFP según el tipo de concepción



Congelados: ciclos de FIV e ICSI con embriones congelados; ICSI: intracytoplasmic sperm injection; FIV: fecundación in vitro; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo

5.3 Influencia de la estimulación hormonal

Nuestro grupo a estudio de 2042 gestaciones obtenidas tras reproducción asistida fue dividido en dos grupos atendiendo a si los embarazos obtenidos resultaban de un ciclo realizado con estimulación hormonal (estimulados; n=907) o sin ella (no estimulados; n=907); en este último grupo se incluyeron las gestaciones obtenidas con ovodón y transferencia de congelados. Los resultados de los marcadores del primer trimestre expresados como media e intervalo de confianza al 95% están representados en la tabla 11.

Tabla 11. Valores de los marcadores del primer trimestre expresados como media e IC (95%) en ciclos estimulados, no estimulados y naturales.

| Modo de concepción | TN (MoM) | β -hCG (MoM) | PAPP-A (MoM) | TFP % |
|--------------------|---------------------|---|---|---|
| Controles | 0,98 (0,96-0,99) | 1,07 (1,03-1,11) | 1,07 (1,02-1,11) | 5,20 (4,23-6,17) |
| No estimulados | 0,97 (0,95-0,99) | 1,24^a (1,17-1,32) | 1,02 (0,95-1,08) | 3,90 (2,60-5,20) |
| Estimulados | 0,97 (0,95-0,99) | 1,17 (1,10-1,23) | 0,88^a (0,83-0,93) | 8,00^a (6,20-9,80) |

No estimulados: ovodón y transferencia de congelados

^a: Datos estadísticamente significativos comparados con controles ; $p < 0,05$

TN: translucencia nucal; β -hCG; fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; TFP: tasa de falsos positivos; FIV: fecundación in vitro; ICSI: intracytoplasmic sperm injection

No hay diferencias en los valores de la TN entre los tres grupos. Sin embargo los valores de β -hCG son mayores en los grupos de TRA (estimulados y no estimulados) respecto al grupo control alcanzando significación estadística en el grupo de ciclos no estimulados ($p < 0,05$). Por otro lado los niveles de PAPP-A se hallan significativamente más bajos en el grupo de gestaciones obtenidas con ciclos de TRA estimulados cuando se comparan tanto con el grupo control como con el grupo de ciclos no estimulados conllevando una tasa de falsos positivos significativamente mayor (Tabla 11).

Por otro lado se analizó si la terapia hormonal sustitutiva con estrógenos para la preparación endometrial influía en ciclos con embriones congelados comparando dentro de este grupo aquellas pacientes a las que se les había realizado transferencia de congelados en ciclo natural y aquellas en las que se había llevado a cabo una preparación endometrial previa con estrógenos (Tabla 12).

Tabla 12. Comparación de los marcadores bioquímicos en gestaciones únicas obtenidas con embriones congelados según el método de preparación endometrial

| Marcador | Preparación endometrial | n | Media (MoM) IC (95%) | p |
|---------------|-------------------------|-----|------------------------------------|-------|
| PAPP-A | Natural | 106 | 1,05(0,94-1,16) | 0,013 |
| | THS | 113 | 0,78(0,70-0,86)^a | |
| β-hCG | Natural | 106 | 1,23(1,08-1,38) | 0,09 |
| | THS | 113 | 1,03(0,72-1,34) | |

^a: Datos estadísticamente significativos comparado con ciclo natural; $p < 0,05$; THS: terapia hormonal sustitutiva (administración oral o transdérmica de estrógenos); β-hCG; fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo

En 41 casos, la transferencia de embriones congelados se realizó con una preparación diferente y no fueron incluidos en este análisis.

Los datos muestran una significativa reducción en los valores de PAPP-A en el grupo en el que se realizó preparación endometrial previa con estrógenos (Tabla 12).

5.4 Parámetros clínicos y de laboratorio

También se analizó el posible efecto de diferentes parámetros clínicos y de laboratorio en los marcadores del cribado del primer trimestre.

5.4.1 Protocolo de estimulación ovárica: agonistas de la GnRH (protocolo largo) vs antagonistas de la GnRH (protocolo corto)

En cuanto al protocolo de estimulación ovárica utilizado en los ciclos de FIV/ICSI (protocolo largo con agonistas de la GnRH o protocolo corto con antagonistas de la GnRH) no se observó influencia del mismo en los parámetros bioquímicos ni en la tasa de falsos positivos en el grupo con ovocitos propios ni con ovocitos donados (Tablas 13 y 14).

Tabla 13. Marcadores del primer trimestre y tasa de falsos positivos (TFP) según el protocolo de estimulación ovárica, en gestaciones con ovocitos propios

| Protocolo de estimulación ovárica | TN (MoM) | β -hCG (MoM) | PAPP-A (MoM) | TFP % |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| Agonistas de GnRH (protocolo largo) | 0,96 (0,94-0,98) | 1,23 (1,16-1,30) | 0,96 (0,90-1,02) | 4,9 (3,52-6,28) |
| Antagonistas de GnRH (protocolo corto) | 0,96 (0,94-0,98) | 1,19 (1,10-1,28) | 0,91 (0,84-0,98) | 7,5 (5,01-9,99) |

Datos expresados como media IC 95%; TN: translucencia nucal; β -hCG; fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; TFP: tasa de falsos positivos

Tabla 14. Marcadores del primer trimestre y tasa de falsos positivos (TFP) según el protocolo de estimulación ovárica, en gestaciones con ovocitos donados

| Protocolo de estimulación ovárica | TN (MoM) | β -hCG (MoM) | PAPP-A (MoM) | TFP % |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Agonistas de GnRH (protocolo largo) | 0,94 (0,92-0,96) | 1,32 (1,21-1,43) | 1,07 (0,97-1,17) | 2,8 (1,24-4,36) |
| Antagonistas de GnRH (protocolo corto) | 1,01 (0,93-1,09) | 1,46 (0,99-1,85) | 0,98 (0,64-1,32) | 8,9 (0,58-17,22) |

Datos expresados como media IC 95%; TN: translucencia nucal; β -hCG; fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; TFP: tasa de falsos positivos;

5.4.2 Tipo de gonadotropinas utilizadas en la estimulación ovárica: FSH vs actividad LH (LH/hMG) vs otros

En las tablas 15 y 16 se encuentran representados los valores de los marcadores del primer trimestre en función del tipo de gonadotropinas utilizadas dividiendo la muestra en tres grupos: aquellas gestaciones en las que se utilizó FSH en la estimulación, un segundo grupo en el que se utilizaron fármacos con actividad LH (LH ó hMG) y un tercer grupo que hemos denominado “otros” en el que se utilizaron otros fármacos para la estimulación. Hemos diferenciado también si los ovocitos fueron propios o donados.

De acuerdo al tipo de gonadotropinas utilizadas para la estimulación ovárica, se observa que en los ciclos con ovocitos propios en los que sólo se utilizó FSH presentaron una reducción significativa en los valores de PAPP-A (MoM) pero sin repercusión en la TFP (Tabla 15).

Tabla 15. Marcadores del primer trimestre y tasa de falsos positivos (TFP) según el tipo de gonadotropinas administradas en gestaciones con ovocitos propios

| Tipo de Gonadotropinas | β -hCG (MoM) | PAPP-A (MoM) | TFP (%) |
|------------------------------|---------------------|---|---------------------|
| FSH | 1,06 (0,86-1,26) | 0,72 (0,59-0,85)^{b,c} | 5,5 (0,82-10,18) |
| Actividad LH (hMG/LH) | 1,17 (1,10-1,24) | 0,92 (0,86-0,98) ^a | 7,2 (1,89-12,51) |
| Otros | 1,13 (1,04-1,22) | 0,98 (0,89-1,06) ^a | 5,9 (3,89-12,51) |

Datos expresados como media IC 95%.

^a: *Datos estadísticamente significativos comparados con el grupo FSH :p< 0,05*

^b: *Datos estadísticamente significativos comparados con el grupo “actividad LH” :p< 0,05*

^c: *Datos estadísticamente significativos comparados con el grupo “otros” :p< 0,05*

Tabla 16. Marcadores del primer trimestre y tasa de falsos positivos (TFP) en la receptora según el tipo de gonadotropinas administradas en la donante de óvulos.

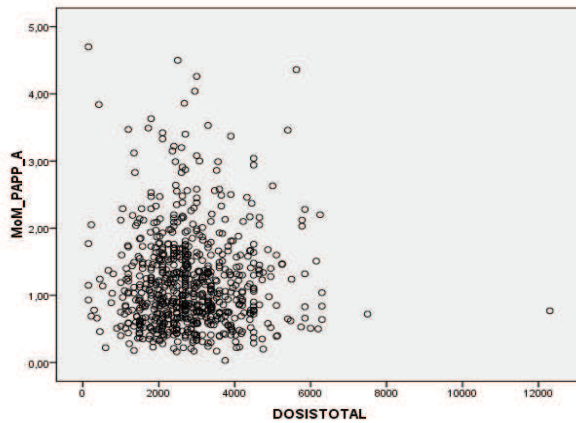
| Tipo de gonadotropinas | TN (MoM) | β -hCG (MoM) | PAPP-A (MoM) | TFP % |
|------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| FSH | 0,98 (0,93-1,03) | 1,20 (1,05-1,35) | 1,01 (0,84-1,19) | 6,1 (2,23-9,97) |
| Actividad LH (hMG/LH) | 0,94 (0,91-0,97) | 1,31 (1,18-1,45) | 1,03 (0,92-1,13) | 1,9 (0,41-3,39) |
| Otros | 0,95 (0,92-0,98) | 1,32 (1,14-1,51) | 1,07 (0,91-1,22) | 3,7 (0,79-6,61) |

Datos expresados como media IC 95%;TN: translucencia nucal; β -hCG; fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; TFP: tasa de falsos positivos;

5.4.3 Dosis total de gonadotropinas administradas

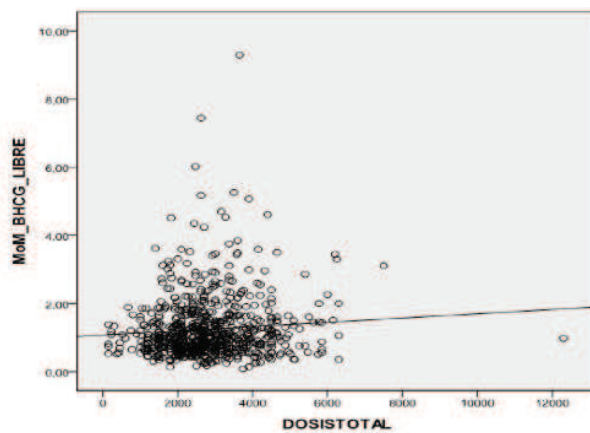
La dosis total de gonadotropinas administradas no se correlacionó con los valores de PAPP-A (MoM) y sólo marginalmente con los valores de β -hCG (MoM) (coeficiente de correlación de Pearson: 0,082; p=0,027) (Figuras 14 y 15).

Figura 14. Relación entre la dosis total de gonadotrofinas administradas y la PAPP-A



Coefficiente de correlación de Pearson = - 0,013
No significativo $p = 0,720$

Figura 15. Relación entre la dosis total de gonadotrofinas y la β -hCG



Coefficiente de correlación de Pearson : 0,082
Relación estadísticamente significativa $p = 0,027$

5.4.4 Etiología de la infertilidad (masculina, femenina, mixta)

No se observó influencia de la etiología de la infertilidad (masculina, femenina o mixta) en los marcadores bioquímicos ni en la TN (Tabla 17).

Tabla 17. Marcadores del cribado del primer trimestre en función del tipo de esterilidad de base (femenina, masculina o mixta)

| Tipo de Esterilidad | TN (MoM) | β -hCG (MoM) | PAPP-A (MoM) | TFP |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| Femenina | 0,90 (0,86-0,94) | 1,24 (1,05-1,43) | 0,91 (0,76-1,05) | 4,9 (1,09-8,71) |
| Masculina | 0,96 (0,93-0,99) | 1,18 (1,06-1,30) | 0,88 (0,80-0,96) | 5,3 (2,85-7,75) |
| Mixta | 0,97 (0,95-0,99) | 1,20 (1,15-1,26) | 0,97 (0,92-1,02) | 6,3 (4,96-7,64) |

Datos expresados como media IC 95%; TN: translucencia nuchal; β -hCG; fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; TFP: tasa de falsos positivos

5.4.5 Influencia del DGP

No hemos observado que el DGP afecte a los parámetros del cribado del primer trimestre (Tabla 18).

Tabla 18. Variables del cribado del primer trimestre dentro del grupo de ICSI con ovocitos propios en función de si se había realizado o no DGP

| | PAPP-A (MoM) | β-hCG (MoM) |
|---------------|-------------------------|---|
| DGP No | 1,18 (1,12-1,24) | 1,29 (1,20-1,37) |
| DGP Si | 1,16 (1,04-1,27) | 1,23 (1,10-1,36) |

Datos expresados como media IC 95%; TN: translucencia nucal; β -hCG; fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; TFP: tasa de falsos positivos

5.5 Influencia de la embrioreducción (*vanishing*)

No se ha observado que la existencia de un *vanishing twin* influya en las variables del cribado del primer trimestre (Tabla 19).

Tabla 19. Variables bioquímicas del cribado del primer trimestre en el grupo de pacientes con TRA en las que hubo una embrioreducción espontánea (*vanishing*)

| | PAPP-A (MoM) | β -hCG (MoM) |
|---------------------|---------------------|-----------------------|
| Vanishing | 1.70 (0,43-2.98) | 1,01 (0,30-1,72) |
| No Vanishing | 1,06 (1,01-1,10) | 1,07 (1,02-1,11) |

Datos expresados como media IC 95%; TN: translucencia nucal; β -hCG; fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; TFP: tasa de falsos positivos

6 DISCUSIÓN

Las gestaciones obtenidas mediante reproducción asistida difieren de las gestaciones espontáneas en varios aspectos, entre ellos una mayor carga psicológica y económica por lo que para estas pacientes es especialmente importante y complicado realizar un correcto cribado del síndrome de Down.

En general, la proporción de pacientes mayores de 35 años es mayor en el grupo de gestaciones obtenidas mediante reproducción asistida, luego el riesgo por edad de tener un feto afecto de síndrome de Down es también mayor^{57,75-77}. Habitualmente estas pacientes prefieren evitar una técnica invasiva (amniocentesis o BVC) para el diagnóstico de síndrome de Down por el riesgo de aborto asociado, de ahí la importancia de determinar qué tipo de ajustes son necesarios en el cribado disminuyendo la TFP sin modificar la sensibilidad de la prueba. La singularidad de las TRA, que incluye los múltiples tipos y opciones de tratamiento y protocolos de estimulación ovárica, la respuesta individual a la estimulación hormonal y las diversas causas de esterilidad hace difícil determinar si todos o sólo algunos de estos embarazos requieren un ajuste del cribado de síndrome de Down, y en caso necesario, cuál sería el método de corrección óptimo para el cribado en estas pacientes. Todas estas cuestiones justifican la

importancia de este estudio para intentar aclarar en qué subgrupos de mujeres pueden existir alteraciones en los marcadores del cribado, qué factores parecen influir y si hay o no que realizar ajustes en esta población.

Respecto a trabajos previos, el presente estudio incluye la mayor serie hasta la fecha de cribados del primer trimestre realizado en gestaciones obtenidas mediante ICSI, ovodonación y transferencia de embriones congelados.

6.1 Marcadores ecográficos

Aunque algunos estudios han mostrado diferencias en la TN en gestaciones obtenidas tras TRA respecto a gestaciones naturales observando bien un aumento^{6, 110, 113} o una disminución^{5, 96} la mayoría de las publicaciones hasta la fecha muestran que la TN no se modifica en función del modo de concepción^{18, 50, 55, 56, 97, 99, 100, 102, 104, 105, 110, 115, 126}. Por lo tanto, el grosor de la TN parece ser el parámetro menos afectado en las gestaciones de TRA. Nuestros resultados concuerdan con estos hallazgos, ya que no hemos observado diferencias en el grosor de la TN en las comparaciones realizadas entre las diversas TRA y los embarazos de concepción natural.

Algunos de los autores que han encontrado diferencias en cuanto a los valores de la TN han sugerido que éstas podrían deberse

a un error inherente a los múltiples análisis estadísticos realizados⁵ o a efectos del operador, ya que las ecografías que se hacen a gestantes con embarazos obtenidos tras reproducción asistida son con frecuencia realizadas en centros especializados, por un pequeño y concreto subgrupo de ecografistas vinculados a este tipo de centros, habitualmente certificados por la FMF, con una menor variabilidad intra e interobservador respecto a las realizadas en el caso de gestaciones naturales⁶ que habitualmente se controlan en centros públicos existiendo generalmente más variabilidad en los ecografistas y por tanto en las mediciones. Por otro lado, desde el punto de vista fisiopatológico no existen razones biológicas obvias que justifiquen diferencias en la TN en gestaciones obtenidas mediante FIV/ICSI¹²⁷.

Por lo tanto, los datos obtenidos hasta el momento actual sugieren que las TRA no influyen en los valores de TN por lo que no son necesarios ajustes de este marcador, en el cribado de síndrome de Down del primer trimestre.

Recientemente, se han introducido nuevos parámetros ecográficos (*ductus* venoso, hueso nasal y flujo tricuspídeo) en el denominado cribado ampliado de síndrome de Down en el primer trimestre¹²⁸. Desgraciadamente, no hemos podido investigar en esta Tesis las posibles diferencias en estos nuevos parámetros ecográficos

entre TRA y concepción natural, porque en el período analizado no realizábamos sistemáticamente su estudio en nuestras pacientes. No obstante, como nos parece ésta también una cuestión importante, intentaremos abordarlo en una próxima investigación.

6.2 Marcadores bioquímicos

Al contrario de lo que ocurre con la TN, los marcadores bioquímicos sí parecen estar afectados por las TRA, tal y como sostienen la mayoría de estudios previos (Tabla 3). En nuestro trabajo, el grupo de TRA globalmente muestra un aumento significativo en los valores de β -hCG libre y una disminución significativa del PAPP-A comparado con los embarazos de concepción natural (Tabla 6), aunque sin conllevar estos cambios un aumento significativo en la TFP. Partiendo de esa base analizamos los marcadores mencionados en los diferentes subgrupos de TRA.

Hasta el momento actual, veinte estudios han sido publicados en la literatura de habla inglesa sobre este tema (Tabla 3).

Los resultados de los estudios previos y del presente trabajo se resumen en lo siguiente:

a) En nuestro trabajo, cuando comparamos las gestaciones obtenidas tras inseminación artificial con las concepciones naturales no hubo diferencias significativas en los valores de β -hCG libre y de

PAPP-A. Estos datos concuerdan con lo publicado en estudios previos^{56, 97, 99} excepto en el trabajo de Lai *et al* (2003)¹¹¹ en el que los valores de la PAPP-A estaban aumentados, y en el estudio de Lambert–Messerlian *et al* (2006)¹⁸ en el que los valores de PAPP-A se hallaban disminuidos. Sin embargo no se ha visto alterada la TFP en IA, ni en estudios previos ni en nuestro trabajo por lo que no parece necesario realizar ningún ajuste en este grupo.

b) En gestaciones obtenidas mediante FIV/ICSI con ovocitos propios, considerando los estudios más recientes que cuentan con tamaños muestrales mayores e incluyendo nuestro trabajo, las concentraciones de β -hCG libre son similares a las observadas en gestaciones naturales, pero los valores de PAPP-A tienden a ser más bajos, alcanzando significación estadística en la mayoría de estudios especialmente en el grupo de ICSI^{55, 97, 104, 105, 113}.

En nuestro trabajo, cuando dividimos el grupo de estudio según la técnica utilizada (FIV ó ICSI) el cambio más importante observado fue la disminución de los valores de PAPP-A en gestaciones obtenidas mediante FIV e ICSI con ovocitos propios y embriones frescos en comparación con las naturales, siendo sólo significativa esta reducción en el grupo de ICSI, que iba asociado a un aumento significativo de la TFP en el cribado de síndrome de Down del primer trimestre (Tabla 9).

Uno de los motivos por los que estos cambios podrían ser significativos en el grupo de ICSI y no en el de FIV es el hecho de que el tamaño muestral en nuestra serie es grande en ICSI (n=805) pero relativamente pequeño en FIV (n=95). De hecho, series más grandes de FIV han encontrado también valores reducidos de PAPP-A en gestaciones FIV con ovocitos propios y embriones frescos^{5, 6, 114}.

c) Hay sólo dos estudios previos que analizan el grupo de gestaciones obtenidas tras ovodonación en los que las concentraciones de PAPP-A fueron similares a los niveles observados en gestaciones naturales (Bellver *et al*, 2005; Lambert-Messerlian, 2006)^{18, 56}. En el estudio de Bellver *et al* (2005)⁵⁶ los valores de β -hCG en el grupo de ovodonación fueron mayores en ICSI comparado con los embarazos naturales. En nuestro trabajo se observa un aumento en la β -hCG tanto en FIV como en ICSI utilizando ovocitos donados comparado con el grupo control aunque sin repercutir en un aumento en la TFP, probablemente por la menor edad de las donantes (Tabla 9).

d) Otro de los parámetros valorados es la utilización o no de embriones congelados y el empleo de terapia estrogénica de sustitución.

En ciclos realizados con embriones congelados los valores de PAPP-A se encontraron también significativamente reducidos cuando

se empleó terapia estrogénica para la preparación endometrial, pero no en ciclos naturales (embriones congelados sin preparación endometrial) (Tabla 12).

Entre los estudios previos sobre la transferencia de embriones congelados, cinco trabajos no mostraron diferencias en ninguno de estos dos marcadores^{3, 5, 55, 102, 113} aunque los tamaños muestrales fueron pequeños en todos ellos. Sin embargo, el trabajo de Amor *et al* (2009)⁶ encontró que cuando la transferencia embrionaria se llevaba a cabo con cualquier tipo de terapia hormonal (estimulación ovárica o suplementación con estrógenos) los valores de PAPP-A se reducían significativamente, incluso en los ciclos con embriones congelados, y el presente estudio muestra exactamente lo mismo contando con la serie más amplia de ciclos con embriones congelados descrita hasta la fecha.

6.3 Hipótesis fisiopatológicas sobre los cambios del PAPP-A en TRA

Las bases fisiopatológicas que justifican la reducción de los niveles de PAPP-A tras una técnica de reproducción asistida compleja (FIV e ICSI) no son bien conocidas, pero se han propuesto varias teorías al respecto.

La primera teoría es la presencia de múltiples sitios de implantación no visibles mediante ecografía en gestaciones obtenidas tras la transferencia de varios embriones⁵⁷. A pesar de que Novac-Antolic *et al* (2006)¹⁰⁴ hallan en ciclos de FIV/ICSI una disminución significativamente mayor en los valores de PAPP-A cuantos más ovocitos se obtienen, y más embriones se transfieren, otros estudios recientes no lo han confirmado. De hecho, Anckaert *et al* (2008)⁵⁵ no encuentra correlación entre las concentraciones de β -hCG y de PAPP-A y el número de ovocitos obtenidos o el número de embriones transferidos. Por otro lado, Bender *et al* (2010)¹⁰⁵, muestra un incremento significativo en la β -hCG y una disminución en la PAPP-A en embarazos obtenidos mediante FIV y/o ICSI en comparación con gestaciones naturales, pero cuando analizan solo aquellas gestaciones obtenidas tras FIV y/o ICSI, no encuentran diferencias en los marcadores bioquímicos en función del número de embriones transferidos (1, 2 o 3). Esta teoría no parece, por lo tanto, ser confirmada con los datos actuales.

La segunda teoría es la existencia de múltiples cuerpos lúteos generados por la estimulación ovárica que pudieran inducir una reducción en las concentraciones de PAPP-A mediante la producción excesiva de alguna sustancia, como se ha sugerido por ejemplo con

respecto a la inhibina A¹⁰⁴. Esta teoría podría explicar los cambios en los niveles de PAPP-A observados en gestaciones obtenidas mediante FIV/ICSI en las cuales se suelen desarrollar al menos tres cuerpos lúteos, y no en técnicas de reproducción asistida en las que no se desarrollan cuerpos lúteos (ovodonación, transferencia de embriones congelados con terapia de sustitución estrogénica) o en técnicas de bajo rango en las que se desarrollan de uno a tres cuerpos lúteos como máximo (coito dirigido, IA, transferencia de embriones congelados en ciclo natural). Sin embargo, incluso en los ciclos de transferencia de congelados con terapia hormonal de sustitución se han observado algunos cambios bioquímicos, y en los ciclos de FIV/ICSI existen más factores además de la existencia de varios cuerpos lúteos que pueden afectar los niveles de PAPP-A, como la severidad de la esterilidad subyacente, las dosis y tipos de hormonas utilizadas para la estimulación ovárica, y la manipulación ovocitaria y embrionaria en el laboratorio^{3, 6, 110}.

La teoría más aceptable es una alteración en el metabolismo placentario, inducida por alguno de los siguientes factores: la propia esterilidad, los fármacos utilizados para la estimulación ovárica, la manipulación en el laboratorio, o todos ellos. De hecho, las concentraciones más altas de β -hCG en el segundo trimestre y más

bajas de PAPP-A en el primer trimestre descritas en gestaciones normales tras TRA son compatibles con los valores de estos marcadores en edades gestacionales más tempranas.

La esterilidad por sí misma y su severidad pueden estar relacionadas directamente con estos hallazgos. De hecho, Ranta *et al* (2010)¹¹⁷ encontraron que en las gestaciones naturales obtenidas tras un tiempo de gestación mayor de dos años los valores de PAPP-A eran significativamente menores comparados con gestaciones naturales concebidas en un tiempo más corto, y similares a los de aquellos embarazos conseguidos mediante FIV. De este modo, la esterilidad por sí misma y no el tratamiento empleado en las TRA podría ser la responsable de estas modificaciones bioquímicas.

Respecto a los fármacos empleados para la estimulación ovárica Anckaert *et al* (2008)⁵⁵ no encontraron ninguna correlación entre los valores de β -hCG o de PAPP-A y los días de estimulación ovárica con FSH o hMG, las dosis totales de estas hormonas o el número de ovocitos obtenidos. Gjerris *et al* (2009)⁵ tampoco encontraron correlación entre los marcadores bioquímicos y los protocolos de estimulación (largo o corto).

Sin embargo, Amor *et al* (2009)⁶, tal como se ha comentado previamente, encontró una reducción significativa en la PAPP-A

cuando se administraba algún tipo de tratamiento hormonal. Nuestro estudio apoya estos hallazgos ya que al comparar el grupo de TRA al que se le había realizado estimulación hormonal con gonadotropinas con el grupo control o con el grupo de TRA que no había llevado estimulación hormonal (ciclo natural o transferencia de embriones congelados) se observa una disminución significativa en los valores de PAPP-A en el grupo de ciclos estimulados al compararlo con los otros dos conllevando un aumento significativo en la TFP (Tabla 11).

En el presente estudio no encontramos diferencias en los marcadores bioquímicos entre los ciclos realizados con protocolo largo (agonistas GnRH) y los llevados a cabo con protocolo corto (antagonistas GnRH) (Tablas 13 y 14), pero sí hallamos una disminución significativa en los valores de PAPP-A cuando se utilizó FSH sola para la estimulación ovárica, aunque sin impacto sobre la TFP (Tabla 15). La cantidad total de gonadotropinas no se relacionó con la concentración de PAPP-A y solo marginalmente con los niveles de β -hCG (Figuras 14 y 15).

En cuanto a la etiología de la infertilidad, Anckaert *et al* (2008)⁵⁵ mostraron un aumento de los valores de β -hCG en gestantes sin factor masculino de esterilidad (factor femenino o etiología desconocida) en comparación con aquellas con causa masculina, aunque sin diferencias

en los valores de PAPP-A. Sin embargo, en el estudio de Amor *et al* (2009)⁶ y en nuestro trabajo no se encontraron diferencias en ninguno de estos dos marcadores cuando se estudiaron en función de la causa de esterilidad (masculina, femenina o mixta) (Tabla 17).

Respecto al modo de fecundación, hemos observado que en las gestaciones obtenidas mediante ICSI con ovocitos propios los niveles de PAPP-A son más bajos y la TFP más alta que en gestaciones tras FIV con ovocitos propios, observando también esta tendencia cuando comparamos gestaciones tras FIV con ovocitos propios con gestaciones naturales (Figuras 11 y 13). Sin embargo, sólo en el grupo de ICSI estas diferencias fueron significativas en comparación con las gestaciones naturales, probablemente debido al mayor grado de disminución en los valores de PAPP-A. La ICSI añade la agresión sobre la zona pelúcida del ovocito mediante el procedimiento de microinyección espermática, lo cual podría tener un impacto negativo sobre el posterior desarrollo embrionario.

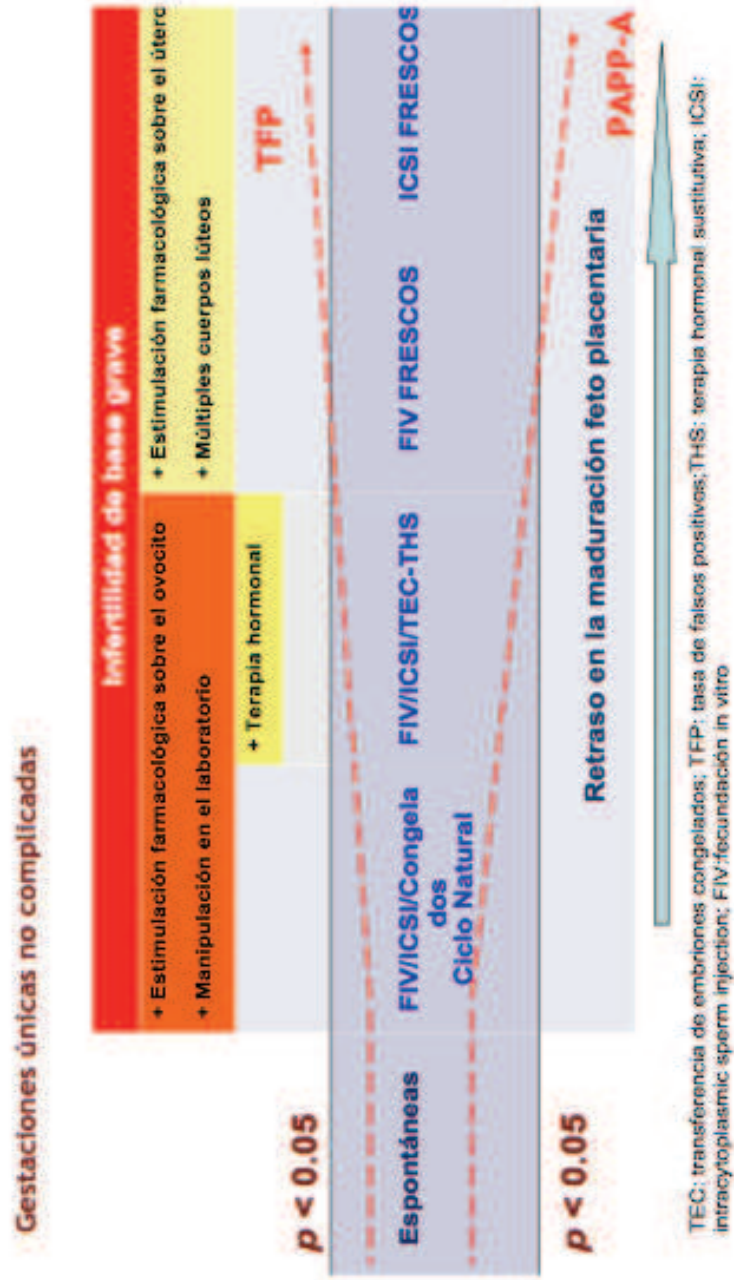
Finalmente, algunos estudios han apuntado que la disminución de PAPP-A en el grupo de TRA podría ser simplemente un marcador de complicaciones obstétricas. Esta teoría se basa en el hecho de que las gestaciones únicas obtenidas mediante TRA presentan una tasa más alta de complicaciones^{87-89, 112, 113} y que la reducción de la

concentración sérica de PAPP-A constituye un marcador predictor de resultados obstétricos adversos debidos a alteraciones placentarias, como retraso del crecimiento, bajo peso al nacimiento o preeclampsia^{118, 119-121}.

Sin embargo, Amor *et al* (2009)⁶ y Bender *et al* (2010)¹⁰⁵, tras excluir sus embarazos complicados aún mostraron una reducción significativa en los valores de PAPP-A en el grupo de TRA en comparación con las gestaciones naturales, aunque no tan marcada como cuando se incluyeron los embarazos complicados. Por lo tanto, los embarazos tras FIV/ICSI presentan valores más bajos de PAPP-A incluso en ausencia de problemas gestacionales.

De acuerdo con nuestros resultados y los datos publicados hasta la fecha, es posible desarrollar una teoría que comprenda toda la información publicada hasta ahora sobre este tema (Figura 16).

Figura 16. Teoría que explicaría el efecto aditivo de los factores relacionados con las técnicas de reproducción asistida en las concentraciones séricas de PAPP-A y la TFP en el cribado del primer trimestre del síndrome de Down



En las gestaciones únicas no complicadas con una infertilidad subyacente importante (FIV o ICSI), varios factores adicionales podrían influir en la maduración placentaria. En el grupo de gestaciones obtenidas tras transferencia de embriones congelados procedentes de ICSI o FIV con ovocitos propios y transferencia en ciclo natural, la estimulación ovárica previa así como la manipulación en el laboratorio podrían haber alterado el ovocito y el embrión.

Cuando la transferencia de embriones congelados se realiza con terapia estrogénica de sustitución o cualquier otro tipo de preparación hormonal, este tratamiento podría también afectar al embrión o al endometrio. Si la TRA consiste en un ciclo de FIV con embriones frescos, se añadiría que la medicación hormonal utilizada para la estimulación ovárica podría también afectar el endometrio, además de generarse múltiples cuerpos lúteos.

Finalmente, si lo que se realiza es una ICSI, habría que añadir a lo previamente descrito la agresión al ovocito por el modo de fecundación.

Así pues, cuantos más factores influyentes añadimos, mayor es la reducción en los niveles de PAPP-A y el incremento en la TFP por un retraso en la maduración placentaria. Sólo cuando los valores de PAPP-A están disminuidos y la TFP aumentada más allá de un

determinado umbral, estos cambios llegan a ser significativos. Esta teoría podría explicar porqué, a pesar de esta tendencia, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los valores de PAPP-A o en la TFP en los estudios en los que se compara la transferencia de embriones congelados en ciclo natural con gestaciones naturales; porqué sólo algunos estudios muestran diferencias cuando se realiza transferencia de embriones congelados con preparación hormonal; porqué muchos de ellos encuentran diferencias en los ciclos de FIV con embriones frescos; y porqué la mayoría de ellos sí muestran diferencias en gestaciones obtenidas tras ICSI.

6.4 Ajuste del cribado de primer trimestre en TRA

Según lo comentado hasta este momento, las gestaciones obtenidas mediante IA no necesitarían ajustes en el cribado del primer trimestre ya que los marcadores bioquímicos no se han visto alterados respecto a gestaciones naturales.

Los embarazos tras ovodonación, a pesar de la elevación significativa de los valores de β -hCG, y probablemente debido a la menor edad de las donantes, no presentan un aumento significativo en la TFP, por lo que tampoco precisan ajustes.

Sin embargo, los embarazos obtenidos mediante FIV e ICSI con ovocitos propios y embriones frescos, sí necesitarían ajustes para los valores de PAPP-A y así reducir el aumento significativo en la TFP (sobre 1-3%), como se deduce de los resultados expuestos en este trabajo y en otros previos^{5,6, 96, 97, 100, 114}.

Varios programas del cálculo del riesgo de síndrome de Down según el resultado del cribado de primer trimestre ya disponen de ajustes para embarazos conseguidos mediante FIV o tras tratamientos hormonales, pero no conocemos ningún programa que disponga de ajustes específicos para ICSI con ovocitos propios y embriones frescos. Según nuestros resultados, sugerimos que una forma de realizar el ajuste en estos casos sería utilizando 0,18 como factor de corrección de las MoM del PAPP-A en este tipo de embarazos. Dicho factor de corrección corresponde a la diferencia de la media de las MoM entre embarazos naturales y embarazos tras ICSI con ovocitos propios y embriones frescos (Tabla 9). Esto es, habría que sumar 0,18 al resultado obtenido de las MoM del PAPP-A con los ajustes convencionales (edad gestacional, peso materno, raza, diabetes y

tabaquismo) en caso de embarazos obtenidos mediante ICSI con ovocitos propios y embriones frescos.

Quizás una de las conclusiones más importantes de la presente Tesis es que, en base a nuestros resultados y el análisis de los trabajos previos, pensamos que no es correcto hacer un ajuste a todos los embarazos de TRA indiscriminadamente, sino que únicamente precisarían ajustes, y sólo del PAPP-A, aquellos embarazos obtenidos mediante FIV y ICSI con ovocitos propios y embriones frescos.

6.5 Consideraciones finales

El cribado de aneuploidias ha evolucionado a lo largo de los años. Comenzó en los años 70 y 80 donde se basó en la edad materna considerando el punto de corte de 35 años para definir al grupo de alto riesgo. Este cribado basado únicamente en la edad materna tenía una tasa de detección de trisomía 21 de sólo un 30 % para una tasa de falsos positivos del 5%. En los años 80 y 90 se introdujo el cribado combinado del segundo trimestre mejorando la tasa de detección hasta un 50-70%, manteniendo la tasa de falsos positivos del 5%. Años después el cribado fue trasladado del segundo al primer trimestre identificando el 90% de los fetos con trisomía 21, 18 y 13. Añadiendo otros marcadores ecográficos (hueso nasal, ductus venoso,

regurgitación tricuspídea) se consigue una tasa de detección mayor del 95% reduciendo la tasa de falsos positivos a menos del 3%¹²⁸.

Los avances más recientes en el cribado de aneuploidías se basan en el análisis del ADN fetal libre circulante en sangre materna¹²⁹¹³². Algunos estudios han demostrado que en gestaciones con un riesgo alto de trisomía 21 el análisis de ADN fetal en plasma materno puede detectar $\geq 99\%$ de casos afectos con una tasa de falsos positivos menor al 1 %^{131, 133, 134}.

En un momento en el que la detección de la trisomía 21 está empezando a poderse realizar mediante un simple análisis de sangre materna^{129, 135} la repercusión más importante de éste u otros estudios es que la producción de PAPP-A parece depender de la presencia de infertilidad y de factores aditivos de agresión asociados a las diferentes técnicas de reproducción asistida. Esto constituye un hallazgo interesante como línea de investigación y se correlaciona con la alta tasa de complicaciones presentes en los embarazos obtenidos mediante reproducción asistida, incluso cuando se trata de gestaciones únicas.

7 CONCLUSIONES

- 1- El cribado del síndrome de Down en el primer trimestre es aplicable a gestaciones conseguidas mediante técnicas de reproducción asistida, pero se debe tener en cuenta que uno de los marcadores bioquímicos, la PAPP-A, está disminuido en embarazos obtenidos tras FIV/ICSI con ovocitos propios y embriones frescos, por lo que se precisa aplicar un factor de corrección para que ello no repercuta en un aumento de la tasa de falsos positivos en este tipo concreto de embarazos. El resto de técnicas de reproducción asistida no precisan ningún tipo de ajuste.
- 2- El grosor de la translucencia nucal no difiere en las gestaciones obtenidas mediante reproducción asistida con respecto a las gestaciones naturales.
- 3- No existen diferencias en los marcadores bioquímicos del cribado del primer trimestre en gestaciones obtenidas tras inseminación artificial en relación a las naturales, por lo que este grupo no precisa ajustes.
- 4- Factores como: la ovodonación, el tipo de protocolo utilizado, el tipo de esterilidad, la dosis y el tipo de gonadotropinas

utilizadas, la congelación embrionaria ,el DGP y la embriorreducción no parecen influir en los marcadores del cribado del primer trimestre por lo que no se precisarían ajustes en estos grupos.

- 5- La presencia de estimulación hormonal influye en los marcadores bioquímicos del cribado del primer trimestre.

8 BIBLIOGRAFIA

1. *Cunningham NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hauth JC, Wenstrom KD. Diagnóstico prenatal y terapéutica fetal. En: Williams Obstetricia. 21 ed. Madrid (España): Médica Panamericana; 2002:831-58.*
2. *Snijders R, Nicolaides, K. Diagnóstico de anomalías cromosómicas en el primer trimestre. En: Nicolaides K. La ecografía de las 11-13+6 semanas. London: Fetal Medicine Foundation; 2004:7-42.*
3. *Bersinger NA, Wunder D, Vanderlick F, Chanson A, Pescia G, Janecek P, et al. Maternal serum levels of placental proteins after in vitro fertilisation and their implications for prenatal screening. Prenat Diagn. 2004 Jun;24(6):471-7.*
4. *Vladareanu RZ, M. Marcadores ecográficos de anomalías cromosómicas. En: Kurjak A, Chervenak FA. Donald School. Ecografía en Obstetricia y Ginecología. 2ª ed. Buenos Aires (Argentina): Médica Panamericana; 2009:180-208.*
5. *Gjerris AC, Loft A, Pinborg A, Christiansen M, Tabor A. First-trimester screening markers are altered in pregnancies conceived after IVF/ICSI. Ultrasound Obstet Gynecol. 2009 Jan;33(1):8-17.*
6. *Amor DJ, Xu JX, Halliday JL, Francis I, Healy DL, Breheny S, et al. Pregnancies conceived using assisted reproductive technologies (ART)*

have low levels of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) leading to a high rate of false-positive results in first trimester screening for Down syndrome. Hum Reprod. 2009 Jun;24(6):1330-8.

7. Sabriá J, Bach, C, Sabriá, E. Marcadores ecográficos frente a marcadores bioquímicos. En: Carrera JM. *Ecografía en diagnóstico prenatal*. Barcelona: Masson; 2008:127-45.

8. Down JL. *Observations on an ethnic classification of idiots*. 1866. *Mental retardation*. 1995 Feb;33(1):54-6.

9. Merkatz IR, Nitowsky HM, Macri JN, Johnson WE. *An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities*. *Am J Obstet Gynecol*. 1984 Apr 1;148(7):886-94.

10. Chard T, Lowings C, Kitau MJ. *Alphafetoprotein and chorionic gonadotropin levels in relation to Down's syndrome*. *Lancet*. 1984 Sep 29;2(8405):750.

11. Bogart MH, Pandian MR, Jones OW. *Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities*. *Prenat Diagn*. 1987 Nov;7(9):623-30.

12. Canick JA, Knight GJ, Palomaki GE, Haddow JE, Cuckle HS, Wald NJ. *Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancies with Down's syndrome*. *Br J Obstet Gynaecol*. 1988 Apr;95(4):330-3.

13. Brambati B, Lanzani A, Tului L. *Ultrasound and biochemical assessment of first trimester pregnancy. En: Chapman M, Grudzinskas JG, Chard T. The embryo: normal and abnormal development and growth. New York: Springer-Verlag;1991:181-94.*
14. Brambati B, Macintosh MC, Teisner B, Maguiness S, Shrimanker K, Lanzani A, et al. *Low maternal serum levels of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) in the first trimester in association with abnormal fetal karyotype. Br J Obstet Gynaecol. 1993 Apr;100(4):324-6.*
15. Van Lith JM, Pratt JJ, Beekhuis JR, Mantingh A. *Second-trimester maternal serum immunoreactive inhibin as a marker for fetal Down's syndrome. Prenat Diagn. 1992 Oct;12(10):801-6.*
16. Aiello H. *III Jornada Internacional VI. Jornada Nacional Anual de SO–GLAP. Screening prenatal de anomalías cromosómicas. 26 y 27 de octubre de 2006 Jockey Club de La Plata.*
17. Canick JA, Lambert-Messerlian GM, Palomaki GE, Neveux LM, Malone FD, Ball RH, et al. *Comparison of serum markers in first-trimester down syndrome screening. Obstet Gynecol. 2006 Nov;108(5):1192-9.*
18. Lambert-Messerlian G, Dugoff L, Vidaver J, Canick JA, Malone FD, Ball RH, et al. *First- and second-trimester Down syndrome screening*

markers in pregnancies achieved through assisted reproductive technologies (ART): a FASTER trial study. Prenat Diagn. 2006 Aug;26(8):672-8.

19. *Hernández de Alba C. Guía practica del diagnostico prenatal. Colombia 1998.*

20. *Gitlin D, Perricelli A, Gitlin GM. Synthesis of -fetoprotein by liver, yolk sac, and gastrointestinal tract of the human conceptus. Cancer research. 1972 May;32(5):979-82.*

21. *Amniotic-fluid alpha-fetoprotein measurement in antenatal diagnosis of anencephaly and open spina bifida in early pregnancy. Second report of the U.K. Collaborative Study on Alpha-fetoprotein in Relation to Neural-tube Defects. Lancet. 1979 Sep 29;2(8144):651-62.*

22. *Burton BK. Elevated maternal serum alpha-fetoprotein (MSAFP): interpretation and follow-up. Clin Obstet Gynecol. 1988 Jun;31(2):293-305.*

23. *Brumfield CG, Cloud GA, Davis RO, Finley SC, Hauth JC, Boots L. The relationship between maternal serum and amniotic fluid alpha-fetoprotein in women undergoing early amniocentesis. Am J Obstet Gynecol. 1990 Sep;163(3):903-6.*

24. *Brock DJ, Sutcliffe RG. Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. Lancet. 1972 Jul 29;2(7770):197-9.*

25. Brock DJ, Bolton AE, Monaghan JM. Prenatal diagnosis of anencephaly through maternal serum-alpha-fetoprotein measurement. *Lancet*. 1973 Oct 27;2(7835):923-4.
26. Wald NJ, Cuckle H, Brock JH, Peto R, Polani PE, Woodford FP. Maternal serum-alpha-fetoprotein measurement in antenatal screening for anencephaly and spina bifida in early pregnancy. Report of U.K. collaborative study on alpha-fetoprotein in relation to neural-tube defects. *Lancet*. 1977 Jun 25;1(8026):1323-32.
27. Burton BK, Sowers SG, Nelson LH. Maternal serum alpha-fetoprotein screening in North Carolina: experience with more than twelve thousand pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 1983 Jun 15;146(4):439-44.
28. Haddow JE, Kloza EM, Smith DE, Knight GJ. Data from an alpha-fetoprotein pilot screening program in Maine. *Obstet Gynecol*. 1983 Nov;62(5):556-60.
29. Milunsky A, Alpert E, Neff RK, Frigoletto FD, Jr. Prenatal diagnosis of neural tube defects. IV. Maternal serum alpha-fetoprotein screening. *Obstet Gynecol*. 1980 Jan;55(1):60-6.
30. Cuckle HS, Wald NJ, Lindenbaum RH. Maternal serum alpha-fetoprotein measurement: a screening test for Down syndrome. *Lancet*. 1984 Apr 28;1(8383):926-9.

31. Spencer K, Crossley JA, Aitken DA, Nix AB, Dunstan FD, Williams K. Temporal changes in maternal serum biochemical markers of trisomy 21 across the first and second trimester of pregnancy. *Annals of clinical biochemistry*. 2002 Nov;39(Pt 6):567-76.
32. Strickland TW, Puett D. Contribution of subunits to the function of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin recombinants. *Endocrinology*. 1981 Dec;109(6):1933-42.
33. Boothby M, Kukowska J, Boime I. Imbalanced synthesis of human choriogonadotropin alpha and beta subunits reflects the steady state levels of the corresponding mRNAs. *J Biol Chem*. 1983 Aug 10;258(15):9250-3.
34. Banerjee S, Smallwood A, Chambers AE, Papageorghiou A, Loosfelt H, Spencer K, et al. A link between high serum levels of human chorionic gonadotrophin and chorionic expression of its mature functional receptor (LHCGR) in Down's syndrome pregnancies. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:25.
35. Renier MA, Vereecken A, Van Herck E, Straetmans D, Ramaekers P, Buytaert P. Second trimester maternal dimeric inhibin-A in the multiple-marker screening test for Down's syndrome. *Hum Reprod*. 1998 Mar;13(3):744-8.

36. Aitken DA, Wallace EM, Crossley JA, Swanston IA, van Pareren Y, van Maarle M, et al. Dimeric inhibin A as a marker for Down's syndrome in early pregnancy. *N Engl J Med*. 1996 May 9;334(19):1231-6.
37. Petraglia F, Sawchenko P, Lim AT, Rivier J, Vale W. Localization, secretion, and action of inhibin in human placenta. *Science*. 1987 Jul 10;237(4811):187-9.
38. Christiansen M, Norgaard-Pedersen B. Inhibin A is a maternal serum marker for Down's syndrome early in the first trimester. *Clin Genet*. 2005 Jul;68(1):35-9.
39. Benn PA, Kaminsky LM, Ying J, Borgida AF, Egan JF. Combined second-trimester biochemical and ultrasound screening for Down syndrome. *Obstet Gynecol*. 2002 Dec;100(6):1168-76.
40. Benn PA, Fang M, Egan JF, Horne D, Collins R. Incorporation of inhibin-A in second-trimester screening for Down syndrome. *Obstet Gynecol*. 2003 Mar;101(3):451-4.
41. Kwick M, Morris, J. Association between first trimester maternal serum pregnancy-associated plasma protein A and adverse pregnancy outcome. *Australian and New Zealand J Obstet Gynecol*. 2003;43:438-42.
42. Brambati B, Tului L, Bonacchi I, Shrimanker K, Suzuki Y, Grudzinskas JG. Serum PAPP-A and free beta-hCG are first-trimester

screening markers for Down syndrome. *Prenat Diagn.* 1994 Nov;14(11):1043-7.

43. Forest JC, Masse J, Moutquin JM. Screening for Down syndrome during first trimester: a prospective study using free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein A. *Clin Biochem.* 1997 Jun;30(4):333-8.

44. Macintosh MC, Brambati B, Chard T, Grudzinskas JG. Predicting fetal chromosome anomalies in the first trimester using pregnancy associated plasma protein-A: a comparison of statistical methods. *Methods Inf Med.* 1993 Apr;32(2):175-9.

45. Macintosh MC, Iles R, Teisner B, Sharma K, Chard T, Grudzinskas JG, et al. Maternal serum human chorionic gonadotrophin and pregnancy-associated plasma protein A, markers for fetal Down syndrome at 8-14 weeks. *Prenat Diagn.* 1994 Mar;14(3):203-8.

46. Comas C, Torrents M, Muñoz A, Echevarría M. Marcadores ecográficos precoces de aneuploidías. En: Carrera JM. *Ecografía en diagnóstico prenatal.* Barcelona: Masson; 2008:103-15.

47. Matias A, Gomes C, Flack N, Montenegro N, Nicolaides KH. Screening for chromosomal abnormalities at 10-14 weeks: the role of ductus venosus blood flow. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1998 Dec;12(6):380-4.

48. Cicero S, Curcio P, Papageorghiou A, Sonek J, Nicolaides K. *Absence of nasal bone in fetuses with trisomy 21 at 11-14 weeks of gestation: an observational study.* *Lancet.* 2001 Nov 17;358(9294):1665-7.
49. Huggon IC, DeFigueiredo DB, Allan LD. *Tricuspid regurgitation in the diagnosis of chromosomal anomalies in the fetus at 11-14 weeks of gestation.* *Heart.* 2003 Sep;89(9):1071-3.
50. Nicolaides KH. *Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities.* *Am J Obstet Gynecol.* 2004 Jul;191(1):45-67.
51. Faiola S, Tsoi E, Huggon IC, Allan LD, Nicolaides KH. *Likelihood ratio for trisomy 21 in fetuses with tricuspid regurgitation at the 11 to 13 + 6-week scan.* *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2005 Jul;26(1):22-7.
52. Kagan KO, Cicero S, Staboulidou I, Wright D, Nicolaides KH. *Fetal nasal bone in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11-13 weeks of gestation.* *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009 Mar;33(3):259-64.
53. Kagan KO, Valencia C, Livanos P, Wright D, Nicolaides KH. *Tricuspid regurgitation in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11+0 to 13+6 weeks of gestation.* *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009 Jan;33(1):18-22.

54. Maiz N, Valencia C, Kagan KO, Wright D, Nicolaides KH. Ductus venosus Doppler in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11-13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009 May;33(5):512-7.
55. Anckaert E, Schiettecatte J, Sleurs E, Devroey P, Smitz J. First trimester screening for Down's syndrome after assisted reproductive technology: non-male factor infertility is associated with elevated free beta-human chorionic gonadotropin levels at 10-14 weeks of gestation. *Fertil Steril.* 2008 Oct;90(4):1206-10.
56. Bellver J, Lara C, Soares SR, Ramirez A, Pellicer A, Remohi J, et al. First trimester biochemical screening for Down's syndrome in singleton pregnancies conceived by assisted reproduction. *Hum Reprod.* 2005 Sep;20(9):2623-7.
57. Weisz B, Rodeck CH. An update on antenatal screening for Down's syndrome and specific implications for assisted reproduction pregnancies. *Hum Reprod Update.* 2006 Sep-Oct;12(5):513-8.
58. Cuckle HS, Wald NJ, Thompson SG. Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level. *Br J Obstet Gynaecol.* 1987 May;94(5):387-402.

59. Cuckle HS, Wald NJ. Low maternal serum alpha-fetoprotein and Down syndrome. *Prenat Diagn.* 1987 Oct;7(8):611-2.
60. Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, Nanchahal K, Canick JA, Haddow JE, et al. Maternal serum unconjugated oestriol as an antenatal screening test for Down's syndrome. *Br J Obstet Gynaecol.* 1988 Apr;95(4):334-41.
61. Wald NJ, Huttly WJ. Validation of risk estimation using the quadruple test in prenatal screening for Down syndrome. *Prenat Diagn.* 1999 Nov;19(11):1083-4.
62. Fortuny A. Cribado prenatal de anomalías cromosómicas fetales. En: Carrera JM. *Ecografía en diagnóstico prenatal.* Barcelona (España): Elsevier-Masson; 2008:155-65.
63. Cuckle H, Benn P, Wright D. Down syndrome screening in the first and/or second trimester: model predicted performance using meta-analysis parameters. *Semin Perinatol.* 2005 Aug;29(4):252-7.
64. Reynolds TM, Penney MD, Hughes H, John R. The effect of weight correction on risk calculations for Down's syndrome screening. *Annals of clinical biochemistry.* 1991 May;28 (Pt 3):245-9.
65. Spencer K, Bindra R, Nicolaides KH. Maternal weight correction of maternal serum PAPP-A and free beta-hCG MoM when screening for

trisomy 21 in the first trimester of pregnancy. Prenat Diagn. 2003 Oct;23(10):851-5.

66. Spencer K, Heath V, El-Sheikhah A, Ong CY, Nicolaides KH. *Ethnicity and the need for correction of biochemical and ultrasound markers of chromosomal anomalies in the first trimester: a study of Oriental, Asian and Afro-Caribbean populations. Prenat Diagn. 2005 May;25(5):365-9.*

67. Spencer K, Bindra R, Cacho AM, Nicolaides KH. *The impact of correcting for smoking status when screening for chromosomal anomalies using maternal serum biochemistry and fetal nuchal translucency thickness in the first trimester of pregnancy. Prenat Diagn. 2004 Mar;24(3):169-73.*

68. Cowans NJ, Stamatopoulou A, Maiz N, Spencer K, Nicolaides KH. *The impact of fetal gender on first trimester nuchal translucency and maternal serum free beta-hCG and PAPP-A MoM in normal and trisomy 21 pregnancies. Prenat Diagn. 2009 Jun;29(6):578-81.*

69. Spencer K, Kagan KO, Nicolaides KH. *Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester: an update of the impact of chorionicity on maternal serum markers. Prenat Diagn. 2008 Jan;28(1):49-52.*

70. 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 Apr;13(4):231-7.

71. Maymon R, Neeman O, Shulman A, Rosen H, Herman A. Current concepts of Down syndrome screening tests in assisted reproduction twin pregnancies: another double trouble. *Prenat Diagn.* 2005 Sep;25(9):746-50.

72. Nicolaides K. La ecografía en las 11-13 semanas. *The Fetal Medicine Foundation. Online education.*

En: <https://courses.fetalmedicine.com/fmf/show/303?locale=en>. [citado en 2012].

73. Bushnik T, Cook JL, Yuzpe AA, Tough S, Collins J. Estimating the prevalence of infertility in Canada. *Hum Reprod.* 2012 Mar;27(3):738-46.

74. Conway DA, Patel SS, Liem J, Fan KJ, Jalian R, Williams J, 3rd, et al. The risk of cytogenetic abnormalities in the late first trimester of pregnancies conceived through assisted reproduction. *Fertil Steril.* 2011 Feb;95(2):503-6.

75. Geipel A, Gembruch U, Ludwig M, Germer U, Schwinger E, Dörmeier A, et al. Genetic sonography as the preferred option of prenatal diagnosis in patients with pregnancies following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1999 Oct;14(10):2629-34.
76. Pinborg A, Loft A, Rasmussen S, Schmidt L, Langhoff-Roos J, Greisen G, et al. Neonatal outcome in a Danish national cohort of 3438 IVF/ICSI and 10,362 non-IVF/ICSI twins born between 1995 and 2000. *Hum Reprod.* 2004 Feb;19(2):435-41.
77. Gjerris AC, Loft A, Pinborg A, Tabor A, Christiansen M. First-trimester screening in pregnancies conceived by assisted reproductive technology: significance of gestational dating by oocyte retrieval or sonographic measurement of crown-rump length. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008 Oct;32(5):612-7.
78. Rubio C, Simon C, Blanco J, Vidal F, Minguez Y, Egozcue J, et al. Implications of sperm chromosome abnormalities in recurrent miscarriage. *J Assist Reprod Genet.* 1999 May;16(5):253-8.
79. Radojčić Badovinac A, Buretić-Tomljanović A, Starčević N, Kapović M, Vlastelić I, Randić L. Chromosome studies in patients with defective reproductive success. *Am J Reprod Immunol.* 2000 Nov;44(5):279-83.

80. Robinson WP, McFadden DE, Stephenson MD. The origin of abnormalities in recurrent aneuploidy/polyploidy. *American journal of human genetics*. 2001 Dec;69(6):1245-54.
81. Bhasin S. Approach to the infertile man. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jun;92(6):1995-2004.
82. Morales C, Sanchez A, Bruguera J, Margarit E, Borrell A, Borobio V, et al. Cytogenetic study of spontaneous abortions using semi-direct analysis of chorionic villi samples detects the broadest spectrum of chromosome abnormalities. *Am J Med Genet A*. 2008 Jan 1;146A(1):66-70.
83. Aboulghar H, Aboulghar M, Mansour R, Serour G, Amin Y, Al-Inany H. A prospective controlled study of karyotyping for 430 consecutive babies conceived through intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2001 Aug;76(2):249-53.
84. Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, et al. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod*. 2002 Oct;17(10):2600-14.
85. Jozwiak EA, Ulug U, Mesut A, Erden HF, Bahceci M. Prenatal karyotypes of fetuses conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2004 Sep;82(3):628-33.

86. Shevell T, Malone FD, Vidaver J, Porter TF, Luthy DA, Comstock CH, et al. Assisted reproductive technology and pregnancy outcome. *Obstet Gynecol.* 2005 Nov;106(5 Pt 1):1039-45.
87. Helmerhorst FM, Perquin DA, Donker D, Keirse MJ. Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *BMJ.* 2004 Jan 31;328(7434):261.
88. Williams C, Sutcliffe A. Infant outcomes of assisted reproduction. *Early Hum Dev.* 2009 Nov;85(11):673-7.
89. Henningsen AK, Pinborg A, Lidegaard O, Vestergaard C, Forman JL, Andersen AN. Perinatal outcome of singleton siblings born after assisted reproductive technology and spontaneous conception: Danish national sibling-cohort study. *Fertil Steril.* 2011 Mar 1;95(3):959-63.
90. Barkai G, Goldman B, Ries L, Chaki R, Dor J, Cuckle H. Down's syndrome screening marker levels following assisted reproduction. *Prenat Diagn.* 1996 Dec;16(12):1111-4.
91. Ribbert LS, Kornman LH, De Wolf BT, Simons AH, Jansen CA, Beekhuis JR, et al. Maternal serum screening for fetal Down syndrome in IVF pregnancies. *Prenat Diagn.* 1996 Jan;16(1):35-8.
92. Frishman GN, Canick JA, Hogan JW, Hackett RJ, Kellner LH, Saller DN, Jr. Serum triple-marker screening in in vitro fertilization and

naturally conceived pregnancies. Obstet Gynecol. 1997 Jul;90(1):98-101.

93. Wald NJ, White N, Morris JK, Huttly WJ, Canick JA. Serum markers for Down's syndrome in women who have had in vitro fertilisation: implications for antenatal screening. *Br J Obstet Gynaecol.* 1999 Dec;106(12):1304-6.

94. Raty R, Virtanen A, Koskinen P, Anttila L, Forsstrom J, Laitinen P, et al. Serum free beta-HCG and alpha-fetoprotein levels in IVF, ICSI and frozen embryo transfer pregnancies in maternal mid-trimester serum screening for Down's syndrome. *Hum Reprod.* 2002 Feb;17(2):481-4.

95. Kagan KO, Staboulidou I, Cruz J, Wright D, Nicolaides KH. Two-stage first-trimester screening for trisomy 21 by ultrasound assessment and biochemical testing. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010 Nov;36(5):542-7.

96. Engels MA, Kooij M, Schats R, Twisk JW, Blankenstein MA, van Vugt JM. First-trimester serum marker distribution in singleton pregnancies conceived with assisted reproduction. *Prenat Diagn.* 2010 Apr;30(4):372-7.

97. Liao AW, Heath V, Kametas N, Spencer K, Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomy 21 in singleton pregnancies achieved by assisted reproduction. *Hum Reprod.* 2001 Jul;16(7):1501-4.
98. Niemimaa M, Heinonen S, Seppala M, Hippelainen M, Martikainen H, Ryyanen M. First-trimester screening for Down's syndrome in in vitro fertilization pregnancies. *Fertil Steril.* 2001 Dec;76(6):1282-3.
99. Wojdemann KR, Larsen SO, Shalmi A, Sundberg K, Christiansen M, Tabor A. First trimester screening for Down syndrome and assisted reproduction: no basis for concern. *Prenat Diagn.* 2001 Jul;21(7):563-5.
100. Orlandi F, Rossi C, Allegra A, Krantz D, Hallahan T, Orlandi E, et al. First trimester screening with free beta-hCG, PAPP-A and nuchal translucency in pregnancies conceived with assisted reproduction. *Prenat Diagn.* 2002 Aug;22(8):718-21.
101. Ghisoni L, Ferrazzi E, Castagna C, Levi Setti PE, Masini AC, Pigni A. Prenatal diagnosis after ART success: the role of early combined screening tests in counselling pregnant patients. *Placenta.* 2003 Oct;24 Suppl B:S99-S103.
102. Matilainen M, Peuhkurinen S, Laitinen P, Jarvela I, Morin-Papunen L, Ryyanen M. In combined first-trimester Down syndrome screening, the false-positive rate is not higher in pregnancies conceived after

assisted reproduction compared with spontaneous pregnancies. Fertil Steril. 2011 Jan;95(1):378-81.

103. Geipel A, Gembruch U, Berg C. *Are first-trimester screening markers altered in assisted reproductive technologies pregnancies? Curr Opin Obstet Gynecol. 2011 Jun;23(3):183-9.*

104. Tul N, Novak-Antolic Z. *Serum PAPP-A levels at 10-14 weeks of gestation are altered in women after assisted conception. Prenat Diagn. 2006 Dec;26(13):1206-11.*

105. Bender F, Hecken J, Reinsberg J, Berg C, van der Ven H, Gembruch U, et al. *Altered first-trimester screening markers after IVF/ICSI: no relationship with small-for-gestational-age and number of embryos transferred. Reprod Biomed Online. 2010 Apr;20(4):516-22.*

106. 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 Aug 1;352(9125):343-6.*

107. Wojdemann KR, Shalmi AC, Christiansen M, Larsen SO, Sundberg K, Brocks V, et al. *Improved first-trimester Down syndrome screening performance by lowering the false-positive rate: a prospective*

study of 9941 low-risk women. Ultrasound Obstet Gynecol. 2005 Mar;25(3):227-33.

108. Spencer K, Cowans NJ. ADAM12 as a marker of trisomy 18 in the first and second trimester of pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2007 Sep;20(9):645-50.

109. Spencer K, Macri JN, Aitken DA, Connor JM. Free beta-hCG as first-trimester marker for fetal trisomy. *Lancet.* 1992 Jun 13;339(8807):1480.

110. Maymon R, Shulman A. Serial first- and second-trimester Down's syndrome screening tests among IVF-versus naturally-conceived singletons. *Hum Reprod.* 2002 Apr;17(4):1081-5.

111. Lai TH, Chen SC, Tsai MS, Lee FK, Wei CF. First-trimester screening for Down syndrome in singleton pregnancies achieved by intrauterine insemination. *J Assist Reprod Genet.* 2003 Aug;20(8):327-31.

112. Maymon R, Shulman A. Integrated first- and second-trimester Down syndrome screening test among unaffected IVF pregnancies. *Prenat Diagn.* 2004 Feb;24(2):125-9.

113. Hui PW, Tang MH, Lam YH, Yeung WS, Ng EH, Ho PC. Nuchal translucency in pregnancies conceived after assisted reproduction technology. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2005 Mar;25(3):234-8.

114. Kagan KO, Wright D, Spencer K, Molina FS, Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomy 21 by free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A: impact of maternal and pregnancy characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008 May;31(5):493-502.
115. Niemimaa M, Heinonen S, Seppala M, Ryyananen M. The influence of smoking on the pregnancy-associated plasma protein A, free beta human chorionic gonadotrophin and nuchal translucency. *BJOG.* 2003 Jul;110(7):664-7.
116. Maymon R, Shulman A. Comparison of triple serum screening and pregnancy outcome in oocyte donation versus IVF pregnancies. *Hum Reprod.* 2001 Apr;16(4):691-5.
117. Ranta JK, Raatikainen K, Romppanen J, Pulkki K, Heinonen S. Increased time-to-pregnancy and first trimester Down's syndrome screening. *Hum Reprod.* 2010 Feb;25(2):412-7.
118. Papageorgiou AT, Leslie K. Uterine artery Doppler in the prediction of adverse pregnancy outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2007 Apr;19(2):103-9.
119. Gagnon A, Wilson RD, Audibert F, Allen VM, Blight C, Brock JA, et al. Obstetrical complications associated with abnormal maternal serum markers analytes. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada:*

JOGC = *Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada* : JOGC. 2008 Oct;30(10):918-49.

120. Pihl K, Larsen T, Krebs L, Christiansen M. First trimester maternal serum PAPP-A, beta-hCG and ADAM12 in prediction of small-for-gestational-age fetuses. *Prenat Diagn.* 2008 Dec;28(12):1131-5.

121. Goetzinger KR, Singla A, Gerkowicz S, Dicke JM, Gray DL, Odibo AO. Predicting the risk of pre-eclampsia between 11 and 13 weeks' gestation by combining maternal characteristics and serum analytes, PAPP-A and free beta-hCG. *Prenat Diagn.* 2010 Dec;30(12-13):1138-42.

122. Zhong Y, Bradshaw R, Stanley AP, Odibo AO. The impact of assisted reproductive technology on the association between first-trimester pregnancy-associated plasma protein a and human chorionic gonadotropin and adverse pregnancy outcomes. *American journal of perinatology.* 2011 May;28(5):347-54.

123. Spencer K, Staboulidou I, Nicolaides KH. First trimester aneuploidy screening in the presence of a vanishing twin: implications for maternal serum markers. *Prenat Diagn.* 2010 Mar;30(3):235-40.

124. Gjerris AC, Loft A, Pinborg A, Christiansen M, Tabor A. The effect of a 'vanishing twin' on biochemical and ultrasound first trimester

screening markers for Down's syndrome in pregnancies conceived by assisted reproductive technology. *Hum Reprod.* 2009 Jan;24(1):55-62.

125. Nicolaides KH, Snijders RJ, Cuckle HS. Correct estimation of parameters for ultrasound nuchal translucency screening. *Prenat Diagn.* 1998 May;18(5):519-23.

126. Maymon R, Dreazen E, Rozinsky S, Bukovsky I, Weinraub Z, Herman A. Comparison of nuchal translucency measurement and mid-gestation serum screening in assisted reproduction versus naturally conceived singleton pregnancies. *Prenat Diagn.* 1999 Nov;19(11):1007-11.

127. Gjerris AC, Tabor A, Loft A, Christiansen M, Pinborg A. First trimester prenatal screening among women pregnant after IVF/ICSI. *Hum Reprod Update.* 2012 Jul;18(4):350-9.

128. Nicolaides KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn.* 2011 Jan;31(1):7-15.

129. Sparks AB, Wang ET, Struble CA, Barrett W, Stokowski R, McBride C, et al. Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenat Diagn.* 2012 Jan;32(1):3-9.

130. Shulman LP. One small step and one giant leap for noninvasive prenatal screening: an editorial. *Am J Obstet Gynecol.* 2011 Mar;204(3):183-5.

131. Ashoor G, Syngelaki A, Wagner M, Birdir C, Nicolaides KH. *Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. Am J Obstet Gynecol.* 2012 Apr;206(4):322 e1-5.
132. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, Rezende JC, Nicolaides KH. *Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013 Jan;41(1):26-32.
133. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, Leung TY, Sun H, Chan KC, et al. *Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. BMJ.* 2011;342:c7401.
134. Chiu RW, Lo YM. *Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age. Semin Fetal Neonatal Med.* 2011 Apr;16(2):88-93.
135. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. *Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet.* 1997 Aug 16;350(9076):485-7.