Universidad de Granada

Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología
Programa de Doctorado de Bioquímica y Biología Molecular

Cribado de anomalías cromosómicas en el primer trimestre de gestación. Validación de la tecnología QF-PCR en relación con el cariotipo en el diagnóstico prenatal de aneuploidías.

Tesis Doctoral
María José de la Paz Gallardo
Granada, 2015

Editorial: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: María José de la Paz Gallardo
ISBN: 978-84-9125-095-1
URI: http://hdl.handle.net/10481/40130

Universidad de Granada

Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología
Programa de Doctorado de Bioquímica y Biología Molecular

Cribado de anomalías cromosómicas en el primer trimestre de gestación. Validación de la tecnología QF-PCR en relación con el cariotipo en el diagnóstico prenatal de aneuploidías.

Tesis Doctoral
María José de la Paz Gallardo
Granada, 2015

D. JOSÉ ANTONIO GÓMEZ CAPILLA,
CATEDRÁTICO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICA:

Que Dª. **María José de la Paz Gallardo**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado Cribado de anomalías cromosómicas en el primer trimestre de gestación. Validación de la tecnología QF-PCR en relación con el cariotipo en el diagnóstico prenatal de aneuploidías. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación, para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

Granada, 2015

Fdo: Prof. Dr. D. J. A. Gómez Capilla

D. TOMÁS DE HARO MUÑOZ, DIRECTOR DE LA U.G.C DEL ÁREA DE LABORATORIOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN CECILIO DE GRANADA

CERTIFICA:

Que Dª. **María José de la Paz Gallardo**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado Cribado de anomalías cromosómicas en el primer trimestre de gestación. Validación de la tecnología QF-PCR en relación con el cariotipo en el diagnóstico prenatal de aneuploidías. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación, para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

Granada, 2015

Fdo. Dr. D. Tomás de Haro Muñoz

Dª. FRANCISCA SONIA MOLINA GARCÍA, FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ÁREA EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA Y ESPECIALISTA EN MEDICINA Y CIRUGÍA FETAL DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN CECILIO DE GRANADA

CERTIFICA:

Que Dª. **María José de la Paz Gallardo**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado Cribado de anomalías cromosómicas en el primer trimestre de gestación. Validación de la tecnología QF-PCR en relación con el cariotipo en el diagnóstico prenatal de aneuploidías. Dicho trabajo ha sido revisado por mí, estando conforme con su presentación, para ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe, para optar al grado de Doctor.

Granada, 2015

Fdo. Dra. Dª. Francisca Sonia Molina García

El doctorando **María José de la Paz Gallardo** y los directores de la tesis **D. José Antonio Gómez Capilla, D. Tomás de Haro Muñoz y Dña. Francisca Sonia Molina García** garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 22 de Enero de 2015

Director/es de la Tesis

Fdo.:
José Antonio Gómez Capilla

Tomás de Haro Muñoz

Francisca Sonia Molina García

Doctorando

Fdo.:
María José de la Paz Gallardo

A mis padres y hermana.
A mi abuela Estefania.
A Antonio, mi compañero de vida.

"La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Pero, ¡que importa! Hay que perseverar y, sobre todo tener confianza en uno mismo".

María Sklodowska Curie

AGRADECIMIENTOS

Llega un momento muy importante y difícil para mí, y es tener que resumir en unos cuantos párrafos lo que siento por aquellas personas que a lo largo de este duro camino han formado parte de mi vida. Quisiera empezar desde el principio; uno de mis objetivos siempre ha sido ser dorctora y por azar, “bendito azar”, llegué al sótano de Medicina a realizar unas prácticas de un máster de análisis, allí me encontré con un laboratorio de Genética formado por un excelente grupo de personas que me acogieron con mucho cariño. La primera persona con la que me encontré y que supuso un punto de inflexión en mi vida fue Adelaida, por ello quiero comenzar hablando de ella. Quiero darle las gracias por confiar en mi desde el principio, por abrirme la puerta a mi sueño, gracias por todo lo que he aprendido estando a tu lado y sobre todo gracias por dejar que yo sí te conozca….sigue viajando y dejando que, a través de tus fotos vea todo lo que tus ojos están viendo.

La segunda persona con la que me encontré en el laboratorio fue a Lola; de ti podría estar hablando casi diez folios, porque es con quien comparto mi día a día, pero quiero resumirlo dándote mil gracias por todo el apoyo que siempre me has dado, gracias por ser cómo eres, por la energía positiva que me transmites, por escucharme y, sobre todo, por tu paciencia conmigo que sabes que soy “algo” nerviosilla y “poco” friolera…. Eres la pila del laboratorio, la que hace que todo funcione tan perfectamente como lo hace, que sería del sótano sin tí!!!!

Y por fín, llegó el momento en el que conocí a un hombre muy importante en mi vida, el Profesor Doctor Capilla. A día de hoy tengo muy presente una frase que me ha repetido constantemente y que dice así: *“Hay tres hombres importantes en tu vida, tu padre, tu pareja y yo tu director de tesis”* y doy fe de que es así. Me siento muy orgullosa y ha sido un verdadero placer pasar día tras día trabajando a su lado, por su carisma, capacidad de trabajo y pasión por la Biología Molecular que, desde el primer momento me ha transmitido. Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar esta tesis, ha sido un pilar fundamental para mí. Gracias por su generosidad.

Cuando conocí a mi directora la Dra. Paqui Molina tuve varias sensaciones, una de ellas fue miedo, miedo porque no sabía si iba a estar a la altura de trabajar con una profesional de su prestigio y capacidad. Cuando la fui conociendo pude comprobar que además de ser una gran profesional era una persona excelente siempre dispuesta a ayudarme en todo lo que fuera necesario, y con una calidad humana increíble, esto último lo sé de buena mano, ya que muchas de las madres que han formado parte de este proyecto me lo han podido confirmar. Por todo esto, me siento verdaderamente orgullosa de haberla conocido y de haber podido trabajar a su

lado. Gracias Paqui por todo lo que he podido aprender de ti, y por todo el apoyo que me has brindado.

Gracias a mi director el Dr. Tomás de Haro por hacerme sentir parte del hospital y facilitarme todos los medios necesarios para sacar adelante esta investigación, sin su ayuda el camino hubiera sido más difícil.

Lo más importante para mí y a los que dedico todo mi esfuerzo y mi vida es a mis padres, Pepa y Emilio, lo que soy es gracias a vosotros. En mis padres he visto lo que es realmente la capacidad de sacrificio y el respeto por el trabajo en el día a día, por ello les doy las gracias por el esfuerzo, por la ilusión y la confianza que me transmiten, siempre habéis estado a mi lado. Os quiero muchísimo!!. A mi hermana Mónica, por todo su apoyo y comprensión hacía el trabajo que estoy desarrollando, gracias —uæ”. A mi abuela Estefanía que ya no se encuentra entre nosotros y que sé que me ayuda en mi día a día. A Antonio, a él especialmente dedico esta tesis por su increíble paciencia y comprensión. Ha sido mi apoyo más importante, el que me ha escuchado día a día, animándome ante cualquier problema y el que ha hecho que me enfrente a todo. Gracias por creer en mí, a veces más que yo misma y animarme a seguir adelante. Gracias por quererme tal y como soy, ha sido la persona que más directamente ha sufrido las consecuencias. Todos los días aprendo estando a tu lado, gracias, te quiero.

Quiero agradecer a todos y cada uno de los que han ido pasando por el laboratorio de Genética de los cuales he aprendido muchísimo, de todo se aprende en la vida. También quiero dar las gracias a los miembros del departamento, que cuando he necesitado cualquier cosa nunca han dudado en ayudarme. Gracias Mercedes que me has demostrado tu apoyo cuando lo he necesitado. A la Dra Roldán por toda su ayuda en la parte estadística de este trabajo.

Para concluir quiero dar las gracias a mis amigos que comparten este mundo de la investigación, en especial a Vane, Juan y Raquel por ser un apoyo muy importante para mí, y a Sergio que siempre está ahí para cualquier cosa que necesito, muchas gracias chicos, os quiero mucho¡¡¡

Ha sido un camino con subidas y bajadas pero que finalmente ha llegado a su fin, lo he recorrido en buena compañía y al final me doy cuenta de que ha merecido realmente la pena.

A todos ellos,
Mil Gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 25

1.1. CRIBADO COMBINADO EN EL PRIMER TRIMESTRE DE GESTACIÓN........ 27

1.1.1. Impacto del riesgo relacionado con la edad materna y edad gestacional en el primer trimestre de embarazo en embarazos cromosómicamente anormales........ 29

1.1.2. Marcadores bioquímicos en suero materno........ 33

1.1.2.1. Proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A)........ 35

1.1.2.2. Gonadotropina coriónica humana (hCG). 36

1.1.3. La Translucencia Nucal como marcador ecográfico........ 38

1.1.4. Marcadores ecográficos secundarios en el primer trimestre de gestación........ 44

1.1.4.1. Hueso nasal........ 46

1.1.4.2. Ductus venoso........ 47

1.1.4.3. Regurgitación tricuspídea. 48

1.2. CÁLCULO DE RIESGO PRENATAL DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS........ 50

1.3. ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS........ 52

1.3.1. Anomalías cromosómicas estructurales........ 52

1.3.2. Anomalías cromosómicas numéricas........ 55

1.3.2.1. Trisomía 21 (Síndrome de Down)........ 57

1.3.2.2. Trisomía 18 (Síndrome de Edwards)........ 64

1.3.2.3. Trisomía 13 (Síndrome de Patau). 65

1.3.2.4. Monosomía X (Síndrome de Turner)........ 66

1.3.2.5. Trisomía XXY (Síndrome de Klinefelter)........ 67

1.4. MECANISMO DE LA NO DISYUNCIÓN MEIÓTICA COMO CAUSANTE DE LAS ANEUPLOIDÍAS. 68

1.4.1. Causas de la no disyunción. 71

1.5. MOSAICISMO CROMOSÓMICO. 73

1.6. DIAGNÓSTICO PRENATAL INVASIVO........ 76

1.6.1. Amniocentesis........ 76

1.6.2. Biopsia de las vellosidades coriales........ 77

1.7. PCR CUANTITATIVA FLUORESCENTE. 79

1.8. DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO. 82
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS. 85
3. MATERIAL Y MÉTODOS 91
3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO. 93
3.2. CRIBADO COMBINADO DEL PRIMER TRIMESTRE. 94
3.2.1. Determinación de los marcadores ecográficos. 95
3.2.1.1. Medida de la Longitud Cráneo-Caudal. 96
3.2.1.2. Medida del grosor de la Translucencia Nucal. 98
3.2.1.3. Valoración del hueso nasal. 101
3.2.1.4. Regurgitación tricuspídea. 103
3.2.1.5. Valoración del ductus venoso. 104
3.2.2. Determinación de los marcadores bioquímicos. 106
3.2.2.1. Proteína A Plasmática Asociada al embarazo (PAPP-A). 106
3.2.2.2. Fracción beta libre de la gonadotropina coriónica humana (fB-hCG). 107
3.2.2.3. Cálculo de los MoM de los parámetros bioquímicos. 108
3.3. CÁLCULO DEL RIESGO INDIVIDUAL DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS. 109
3.4. TÉCNICAS INVASIVAS. 111
3.4.1. Biopsia de las vellosidades coriales. 111
3.4.2. Amniocentesis. 113
3.5. RECEPCIÓN Y REGISTRO DE LAS MUESTRAS EXTRAIDAS EN LA CONSULTA DE DIAGNÓSTICO PRENATAL. 115
3.6. EXTRACCIÓN DEL ADN DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS MEDIANTE TÉCNICAS INVASIVAS. 116
3.6.1. Preparación de las muestras de vellosidad corial para la extracción del ADN. 116
3.6.2. Preparación de las muestras de líquido amniótico para la extracción del ADN. 117
3.6.3. Extracción del ADN de las muestras de vellosidad corial y líquido amniótico. 118
3.6.4. Valoración de la concentración y pureza del ADN extraido. 121
3.7. AMPLIFICACIÓN DEL ADN: Reacción en cadena de la polimerasa. 122
3.7.1. Preparación de la muestra de reacción (Master Mix). 123
3.7.2. Preparación de las muestras y amplificación mediante PCR 123

3.7.3. Preparación de las muestras para la detección de los STRs en el analizador genético ABI PRISM 310. 125
3.8. DETECCIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN. 125
3.8.1. Preparación del ABI PRISM 310. 128
3.8.2. Programación de las muestras. 131
3.8.3. Lista de inyección. 132
3.9. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS. 135
3.10. ANÁLISIS DE LOS CROMOSOMAS MEDIANTE LA QF-PCR Y CARIOTIPO CONVENCIONAL. 139
4. RESULTADOS 141
4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN CRIBADA (Periodo de Mayo de 2009 hasta abril de 2011) 143
4.1.1. Población aneuploide. 145
4.2. EFICACIA DE LA TÉCNICA DE CRIBADO COMBINADO EN EL PRIMER TRIMESTRE. 145
4.3. COMPORTAMIENTO DE LA TRANSLUCENCIA NUCAL EN FETOS EUPLOIDES Y ANEUPLOIDES. 147
4.4. COMPORTAMIENTO DE LOS MARCADORES ECOGRÁFICOS SECUNDARIOS EN FETOS EUPLOIDES Y ANEUPLOIDES. 151
4.5. COMPORTAMIENTO DE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS MATERNOS EN FETOS EUPLOIDES Y ANEUPLOIDES. 152
4.6. VALORACIÓN DE LOS MARCADORES ECOGRÁFICOS EN FETOS ANEUPLOIDES. 154
4.7. ANÁLISIS DE LOS CROMOSOMAS DE LAS PACIENTES QUE SE HAN REALIZADO UNA PRUEBA INVASIVA, DESPUES DE HABERSE SOMETIDO A UN CRIBADO PARA LA DETECCIÓN DE RIESGO DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS (Periodo de Mayo de 2009 hasta diciembre de 2012)..... 156
4.7.1. Detección de muestras euploides. 157
4.7.2. Detección de aneuploidías. 160
4.7.3. Detección de otras anomalías cromosómicas. 164
4.7.4. Detección de mosaicos. 172
4.8. ESTUDIO DEL CARIOTIPO PATERNO Y MATERNO. 180
4.9. QF-PCR VERSUS CARIOTIPO CONVENCIONAL EN EL DIAGNÓSTICO PRENATAL DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS. 182
4.10. RESULTADOS OBSTÉTRICOS DE LAS PACIENTES QUE SE HAN SOMETIDO A UNA PRUEBA INVASIVA. 185
5. DISCUSIÓN 187

5.1. COMPORTAMIENTO DE LA MEDIDA DE LA TRANSLUCENCIA NUCAL 192
5.2. COMPORTAMIENTO DE LA MEDIDA DE LOS MARCADORES ECOGRÁFICOS SECUNDARIOS. 192
5.3. COMPORTAMIENTO DE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS. 194
5.4. LA QF-PCR COMO TÉCNICA INDEPENDIENTE. 195
5.5. QF-PCR VERSUS CARIOTIPO CONVENCIONAL. 197
5.6. RESULTADOS POSTNATALES. 200
6. CONCLUSIONES 201
7. BIBLIOGRAFÍA 205

GLOSARIO DE ABREVIATURAS.

ACTH: Corticotropina.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AFP: Alfafetoproteina.

APP: Proteína precursora de amiloide.

ARN: Ácido ribonucleico.

Aβ: Proteína β-amiloide.

DMR: Regiones diferencialmente metiladas.

DSCAM: Down Syndrome Cell Adhesión Molecule.

DSCR: Región crítica del síndrome de Down.

DSCR1: Down Syndrome Candidate Region-1.

DV: Ductus venoso.

EM: Edad materna.

FCF: Frecuencia cardiaca fetal.

FIV: Fecundación in vitro.

FMF: Fetal Medicine Foundation.

FSH: Folículoestimulante.

FUR: Fecha última regla.

fβ-hCG: Fracción β libre de la gonadotrofina coriónica humana.

GEDDS: Disfunción de dominios de la expresión génica.

H: Hormona Luteinizante.

hCG: Hormona gonadotropina coriónica.

HN: Hueso nasal.

Hsa 21: Cromosoma 21.

IGF: Factores de crecimiento insulinoides.

IGFBP-4: Factor de crecimiento insulinoide-4.

LA: Líquido amniótico.

LCC: Longitud cráneo-caudal.

MI: Meiosis I.

MII: Meiosis II.

MoM: Múltiplos de la mediana.

MPS: Massive parallel sequencing.

NAFT: Factor Nuclear de células T Activadas.

NCTB: Neuronas colinérgica del telencéfalo basal.

NUHSA: Numero Único de historia de salud de Andalucía.

PAPP-A: Proteína plasmática placentaria A.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

QF-PCR: Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction.

RC: Ratio Criteria.

RFU: Unidades relativas de fluorescencia.

ROC: Receiver Operating Characteristic Curve.

RT: Regurgitación tricuspidea.

SEGO: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia.

STRs: Short tandem repeats.

TD: Tasa de detección.

TFP: Tasa de falsos positivos.

TN: Translucencia nucal.

TSH: Hormona estimulante de la tiroides.

uE3: Estriol no conjugado.

UGC: Unidad de Gestión Clínica.

VC: Vellosidad corial.

VPN: Valor predictivo negativo.

VPP: Valor predictivo positivo

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CRIBADO COMBINADO EN EL PRIMER TRIMESTRE DE GESTACIÓN.

Un buen método de cribado es aquel que tiene una alta capacidad de detección (alta sensibilidad) de la ―población de riesgo” y una baja tasa de falsos positivos (alta especificidad) reduciendo los procesos invasivos innecesarios y las tasas de abortos intraútero. El cribado se realiza generalmente para el síndrome de Down ya que es la aneuploidía más común causante de discapacidad y retraso mental severo aunque sí es cierto que este método nos proporciona información sobre la mayoría de los síndromes como la trisomía 18 (Síndrome de Edwards) y trisomía 13 (Síndrome de Patau) siendo la segunda y tercera anomalía cromosómica más frecuente tras la trisomía 21 (Síndrome de Down).

El cribado para la trisomía 21 fue introducido a principios de los años 70 basándose únicamente en la edad materna avanzada. El punto de corte establecido en aquella época para ofrecer a las gestantes la realización de la amniocentesis estaba en 40 años. Años más tarde el punto de corte se estableció en 35 años (Resta, 2002). Su eficacia como método de cribado era mínima ya que su tasa de detección era de un 30% con una tasa de falsos positivos de un 10% (Nicolaides, 2003). Este método basado solo en la edad materna avanzada no es recomendable (Hawk y Saller, 2012) ya que supone la práctica innecesaria de técnicas invasivas con el riesgo que conllevan a las gestantes. Otro problema que genera este tipo de cribado es su baja tasa de detección ya que se acepta que un cribado poblacional debe tener como mínimo una tasa de detección (TD) del 75% con una tasa de falsos positivos (TFP) del 5%.

En los años 80 aparecen los primeros marcadores bioquímicos, se trata de productos feto-placentarios cuya concentración sérica es medida en sangre materna. Existe una relación entre valores bajos de alfafetoproteina (AFP) en el segundo trimestre (semana 16 de gestación) y el síndrome de Down. Se asociaron varias hormonas más, el estriol no conjugado (uE3) y hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), junto con la AFP y la inhibina A que mostraban diferencias significativas en fetos euploides y aneuploides. Estos marcadores bioquímicos aumentaban la tasa de detección en un 50-70% y reducían la tasa de falsos positivos al 5% (Nicolaides et al., 2002).

En los años 90 se introduce la traslucencia nucal (TN) fetal en el cribado para trisomía 21 a las 11–13+^{6} semanas de gestación junto con la edad materna, observándose que el aumento de la TN estaba relacionado con un incremento en el riesgo de padecer algún tipo de cromosomopatía (Nicolaides et al., 1992). El cribado mediante la combinación de la edad materna y el grosor de la translucencia nucal fetal es capaz de identificar alrededor del 75% de aneuploidías con una tasa de falsos positivos de un 5% (Nicolaides et al., 2002).

La incorporación de marcadores bioquímicos, tales como la proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A) y la subunidad beta libre de la gonadotropina coriónica humana (fβ-hCG) en el cribado combinado del primer trimestre se realizó en el año 2000 y supuso aumentar la tasa de detección en un 85-90% de los fetos afectados. Los valores de dichas hormonas van cambiando conforme aumenta la edad gestacional. Así la PAPP-A aumenta normalmente con la gestación, salvo en casos con embarazos con trisomía 21 que disminuye. La β-hCG disminuye a medida que avanza la gestación, sin embargo en embarazos con trisomía 21 sus niveles se encuentran aumentados (Kagan et al., 2008b).

Los valores de los marcadores bioquímicos son transformados a múltiplos de la mediana (MoM) debido a la dificultad en ajustar el tiempo exacto de gestación por ecografía, sumado a que la concentración de los distintos marcadores en suero materno varía con el tiempo de gestación. Los MoM son corregidos según el peso, raza, hábito tabáquico, diabetes gestacional y técnicas de reproducción asistida.

Actualmente el cribado combinado o “screening de primer trimestre” se realiza a todas las gestantes independientemente de la edad materna. El cribado combinado de primer trimestre a las 11-13^{+6} semanas de gestación es el método actual más efectivo en la detección del síndrome de Down (Kagan et al., 2009b; Kagan et al., 2010; Karadzov-Orlić et al., 2012) por ello, es el método de elección para la detección del síndrome de Down con una tasa de detección de aproximadamente un 90% con una tasa de falsos positivos de un 3-5% (Spencer et al., 2000; Bindra et al., 2002; Cicero et al., 2003c; Spencer et al., 2003b; Nicolaides., 2005b; Kagan et al., 2009b; Nicolaides et al., 2011; Ekelund et al., 2012; Ghaffari et al., 2012; Karadzov-Orlic et al., 2012; Molina et al., 2012; Sonek et al., 2012). Este método está basado en la edad materna, edad

gestacional, marcadores bioquímicos (concentración de la fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana y la proteína plasmática A asociada al embarazo. En la tabla 1 se resumen las diferentes estrategias de cribado utilizadas para la detección de la trisomía 21.

Tabla 1. Tasa de detección y tasa de falsos positivos para las diferentes estrategias de cribado (Nicolaides, 2011).

Método de cribado	Tasa de detección (%)	Tasa de fasos positivos (%)
EM	30	5
EM + TN	75-80	5
EM + TN+fβ-hCG+PAPP-A	85-95	5
EM+ TN + fβ-hCG+PAPP-A +TN+Marcadores 2º	93-96	2.5

Abreviaturas: EM=edad materna; TN= Translucencia Nucal

1.1.1. Impacto del riesgo relacionado con la edad materna y edad gestacional en el primer trimestre de embarazo en embarazos cromosómicamente anormales.

La edad materna es un factor importante de riesgo de trisomía 21 y otras aneuploidías, así como de resultados adversos en el embarazo (Khalil et al., 2013; Laopaiboon et al., 2014). Penrose, hace más de 80 años, publicó sus observaciones señalando que las madres mayores de 35 años tenían más hijos con problemas de mongolismo que las madres más jóvenes (Penrose, 1933). Posteriormente, a partir del metaanálisis publicado por Cuckle y colaboradores se reafirmaron sus observaciones poniendo en evidencia que la prevalencia de la mayoría de las cromosomopatías aumenta con la edad materna, siendo este incremento progresivo y más significativo a partir de los 35 años (Figura 1) (Cuckle et al., 1987; Hultén et al., 2010).

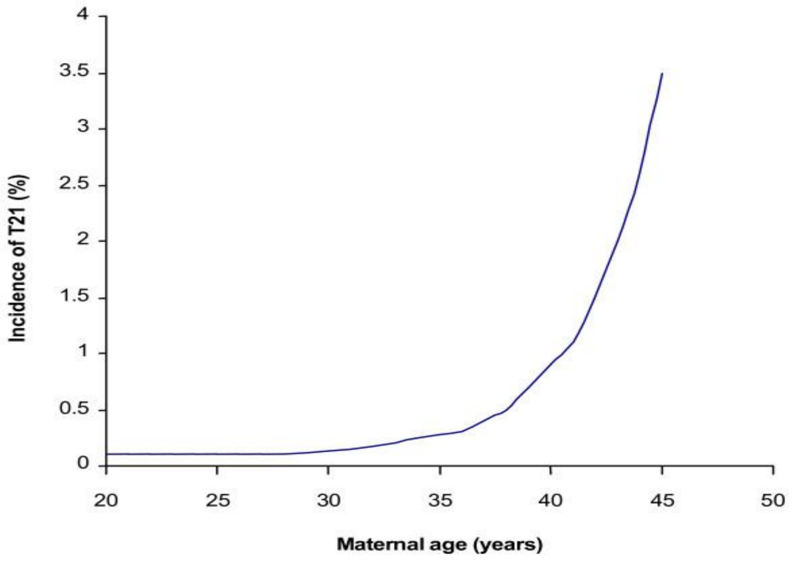


Figura 1. Tasa de natalidad de trisomía 21 en relación con la edad materna (Hultén et al., 2008).

Debido a que muchos fetos aneuploides mueren antes de nacer, el riesgo de que esto ocurra disminuye con la edad gestacional. En el caso particular de la trisomía 21, la tasa de muerte fetal en la semana doce es de un 30% (Tabla 2). Hay que establecer el riesgo específico de cada paciente basado tanto en su edad como en el periodo gestacional en el que se encuentra (Snijders et al., 1995).

Tabla 2. Estimaciones de las tasas de pérdidas espontáneas de los fetos con trisomía 21.

Edad gestacional (semanas)	Tasa de pérdida estimada (%)
10	36
12	30
14	25
16	21

Lo mismo ocurre en el caso de la trisomía 18 y trisomía 13, que aumentan su prevalencia con la edad materna y su probabilidad de supervivencia aumenta con la edad gestacional: 28% a las 12 semanas, 35% a las 18 semanas y el 41% a las 20 semanas (Morris y Savva, 2008). El síndrome de Turner resulta normalmente de la pérdida del cromosoma X del padre por ello no tiene relación con la edad materna. La prevalencia es de alrededor de 1/1.500 en la semana 12, 1/3.000 en la semana 20 y 1/4.000 en la semana 40. Las anomalías cromosómicas sexuales (47,XXX, 47,XXY y 47,XYY) no muestran cambios significativos con la edad materna y no disminuyen con

la edad gestacional debido a que están asociadas a una menor letalidad uterina, el porcentaje de muertes fetales no es mayor que en los fetos euploides siendo de alrededor de 1/500. Las poliploidías no guardan relación con la edad materna y disminuyen con la edad gestacional (Nicolaides y Falcon, 2004).

En las siguientes tablas (Tablas 3-5) se refleja el riesgo de una mujer de tener un hijo afecto de trisomía 21, 18 y 13 en función de su edad y de la edad gestacional.

Tabla 3. Riesgo de tener un niño con trisomía 21 en función de su edad materna y edad gestacional.

AÑOS MADRE	SEMANAS DE GESTACIÓN					
	10	**12**	**14**	**16**	**20**	**40**
20	1/983	1/1068	1/1140	1/1200	1/1295	1/1527
25	1/870	1/946	1/1009	1/1062	1/1147	1/1352
30	1/576	1/626	1/668	1/703	1/759	1/895
31	1/500	1/543	1/580	1/610	1/658	1/776
32	1/424	1/461	1/492	1/518	1/559	1/659
33	1/352	1/383	1/409	1/430	1/464	1/547
34	1/287	1/312	1/333	1/350	1/378	1/446
35	1/229	1/249	1/266	1/280	1/302	1/356
36	1/180	1/196	1/209	1/220	1/238	1/280
37	1/140	1/152	1/163	1/171	1/185	1/218
38	1/108	1/117	1/125	1/131	1/142	1/167
39	1/82	1/89	1/95	1/100	1/108	1/128
40	1/62	1/68	1/72	1/76	1/82	1/97
41	1/47	1/51	1/54	1/57	1/62	1/73
42	1/35	1/38	1/41	1/43	1/46	1/55
43	1/26	1/29	1/30	1/32	1/35	1/41

Tabla 4. Riesgo de tener un niño con trisomía 18 en función de su edad materna y edad gestacional.

AÑOS MADRE	SEMANAS DE GESTACIÓN					
	10	12	14	16	20	40
20	1/1993	1/1993	1/3015	1/3015	1/3015	1/18013
25	1/1765	1/1765	1/2670	1/2670	1/2670	1/15951
30	1/1168	1/1168	1/1766	1/1766	1/1766	1/10554
31	1/1014	1/1014	1/1533	1/1533	1/1533	1/9160
32	1/860	1/860	1/1301	1/1301	1/1301	1/7775
33	1/715	1/715	1/1081	1/1081	1/1081	1/6458
34	1/582	1/582	1/880	1/880	1/880	1/5256
35	1/465	1/465	1/703	1/703	1/703	1/4202
36	1/366	1/366	1/553	1/553	1/553	1/3307
37	1/284	1/284	1/430	1/430	1/430	1/2569
38	1/218	1/218	1/330	1/330	1/330	1/1974
39	1/167	1/167	1/252	1/252	1/252	1/1505
40	1/126	1/126	1/191	1/191	1/191	1/1139
41	1/95	1/95	1/144	1/144	1/144	1/858
42	1/71	1/71	1/108	1/108	1/108	1/644
43	1/53	1/53	1/81	1/81	1/81	1/481

Tabla 5. Riesgo de tener un niño con trisomía 13 en función de su edad materna y edad gestacional.

AÑOS MADRE	SEMANAS DE GESTACIÓN					
	10	12	14	16	20	40
20	1/6347	1/7826	1/9389	1/11042	1/14656	1/42423
25	1/5621	1/6930	1/8314	1/9778	1/12978	1/37567
30	1/3719	1/4585	1/5501	1/6470	1/8587	1/24856
31	1/3228	1/3980	1/4774	1/5615	1/7453	1/21573
32	1/2740	1/3378	1/4052	1/4766	1/6326	1/18311
33	1/2275	1/2806	1/3366	1/3959	1/5254	1/15209
34	1/1852	1/2284	1/2740	1/3222	1/4277	1/12380
35	1/1481	1/1826	1/2190	1/2576	1/3419	1/9876
36	1/1165	1/1437	1/1724	1/2027	1/2691	1/7788
37	1/905	1/1116	1/1339	1/1575	1/2090	1/6050
38	1/696	1/858	1/1029	1/1210	1/1606	1/4650
39	1/530	1/654	1/784	1/922	1/1224	1/3544
40	1/401	1/495	1/594	1/698	1/927	1/2683
41	1/302	1/373	1/447	1/526	1/698	1/2020
42	1/227	1/280	1/335	1/395	1/524	1/1516
43	1/170	1/209	1/251	1/295	1/392	1/1134

1.1.2. Marcadores bioquímicos en suero materno.

En la actualidad, la determinación de la concentración de los productos placentarios del primer trimestre de gestación, la fracción beta libre de la gonadotropina coriónica humana y de la proteína plasmática A asociada al embarazo, son una herramienta eficaz en la detección de anomalías cromosómicas y defectos estructurales fetales. Son proteínas detectadas en el suero materno utilizadas como marcadores bioquímicos para la detección del síndrome de Down y otras aneuploidías ya que, bajo estas circunstancias, muestran cambios significativos en sus concentraciones en el primer trimestre (Figura 2,3) (Kagan et al., 2008b; Wright et al., 2010; Nicolaides et al., 2011). Se pueden modificar sus valores por distintas características maternas como son el peso, origen étnico, tabaco, número de fetos y método de concepción (natural o fertilización in vitro). Estos factores se deben tener en cuenta para el cálculo del riesgo individual de cada paciente (Spencer et al., 2003a; Nicolaides et al., 2005a; Kagan et al., 2008b; Nicolaides et al., 2011).

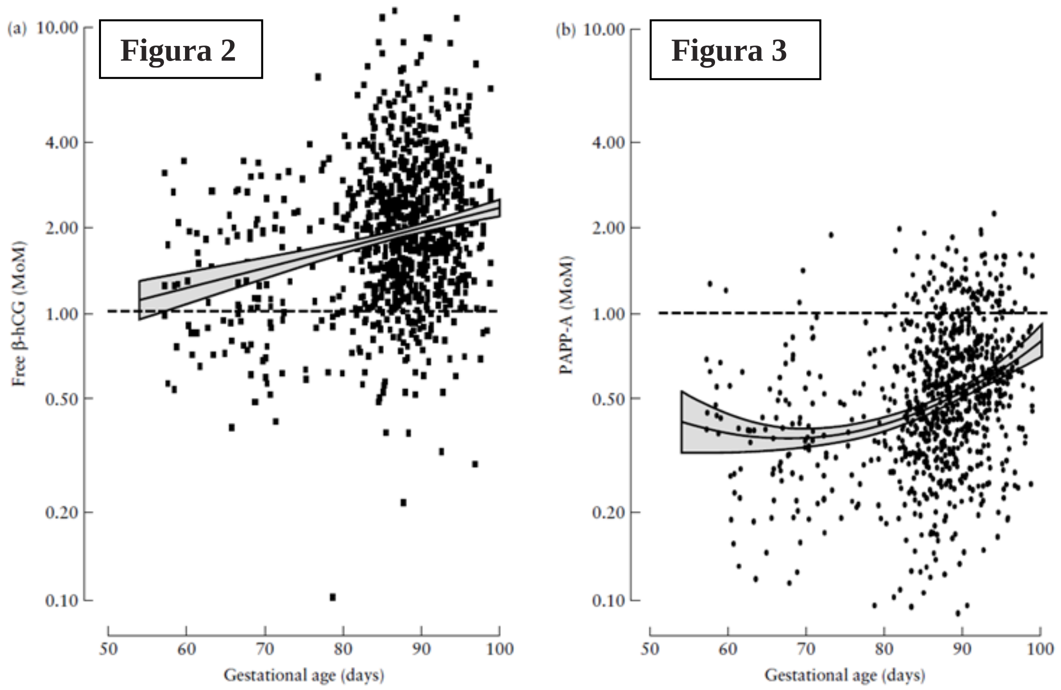


Figura 2. Distribución de la fracción β libre de la gonadotropina coriónica humana en múltiplos de la mediana de acuerdo a la edad gestacional en fetos con trisomía 21. **Figura 3.** Distribución de la proteína plasmática A asociada al embarazo en múltiplos de la mediana de acuerdo a la edad gestacional en fetos con trisomía 21 (Wright et al., 2010).

La combinación de la edad materna y los marcadores bioquímicos β-hCG libre y PAPP-A para la detección de la trisomía 21 tiene una tasa de detección de aproximadamente un 65% con una tasa de falsos positivos del 5% (Kagan et al., 2008b). La PAPP-A como marcador único en el primer trimestre del embarazo, es efectiva en las semanas 9 a 11, después de este periodo aumenta considerablemente la tasa de falsos positivos (Wright et al., 2010).

Las concentraciones de los marcadores bioquímicos varían de manera diferente a medida que avanza la gestación (Spencer et al., 2002). Así, la β-hCG libre disminuye a medida que avanza el embarazo, sin embargo, en fetos con trisomía 21 esta hormona aumenta su concentración en el suero materno (aproximadamente 2 MoM en la semana 12) (Tabla 6). Al contrario ocurre con la PAPP-A, esta hormona aumenta progresivamente con la gestación, pero en fetos portadores de alguna anomalía se ve disminuida en aproximadamente 0.4 MoM (Tabla 6).

Tabla 6. Variación de los marcadores bioquímicos del primer trimestre en fetos aneuploides.

Hormonas Maternas	Trisomía 21	Trisomía 18	Trisomía 13
PAPP-A (MoM)	<0.4	<0.2	<0.5
fβ-hCG (MoM)	≥2.5	<0.3	<0.5

A la hora de calcular el riesgo específico de cada paciente hay que tener en cuenta una serie de consideraciones:

- Las concentraciones varían a lo largo del tiempo: es preciso una datación correcta de la gestación y el ajuste de los parámetros de la paciente como es el peso, la edad, la talla, la presencia de gestación única o múltiple, diabetes, hábito tabáquico y la raza (Kagan et al., 2008b; Ball et al., 2013).
- En cada gestante el valor de la β-hCG libre y PAPP-A representa un cociente de probabilidad que se multiplica por el riesgo a priori para calcular el nuevo riesgo.
- A mayor nivel de β-hCG libre y menor nivel de PAPP-A, mayor riesgo de padecer algún defectos cromosómico.

Hay estudios que señalan que en el screening del primer trimestre el uso de marcadores bioquímicos antes de la exploración de la TN puede optimizar el

rendimiento de detección. El momento de realización más óptimo sería a las 9-10 semanas (Wright et al., 2010; Ekelund et al., 2012).

1.1.2.1. Proteína plasmática A asociada al embarazo (PAPP-A).

La proteína plasmática A asociada al embarazo es una glicoproteína de 500 kDa aislada por primera vez por Lin y colaboradores (1976) en sangre materna de mujeres embarazadas. Se sintetizada en el sincitiotrofoblasto y se libera a la circulación materna durante el periodo de gestación, aumentando conforme avanza el embarazo.

Es un marcador bioquímico muy eficaz en el primer trimestre, principalmente cuando se realiza a las 11 semanas. La PAPP-A disminuye significativa entre las 6-13 semanas en todas las cromosomopatías (valor más bajo a las 11 semanas), no ocurre igual en el segundo trimestre en el que su concentración no varía.

Se trata de una proteasa de la proteína de unión del factor de crecimiento insulinoide-4 (IGFBP-4), que actúa en la interfase materno fetal degradando a la IGFBP-4 (Sun et al., 2002) y por ende incrementando la biodisponibilidad de los factores de crecimiento insulinoides (IGF) libres en la placenta, importantes para el crecimiento fetal y placentario durante la gestación. La IGF promueve la invasión trofoblástica hacía la decidua materna mediada por el IGF-II y probablemente modulando la regulación que ejercen el IGF-I sobre la esteroidogénesis y sobre el transporte de glucosa y aminoácidos en las vellosidades placentarias (Figura 4) (Gerulewicz Vannini y Hernández-Andrade, 2007; Shiefa et al., 2013).

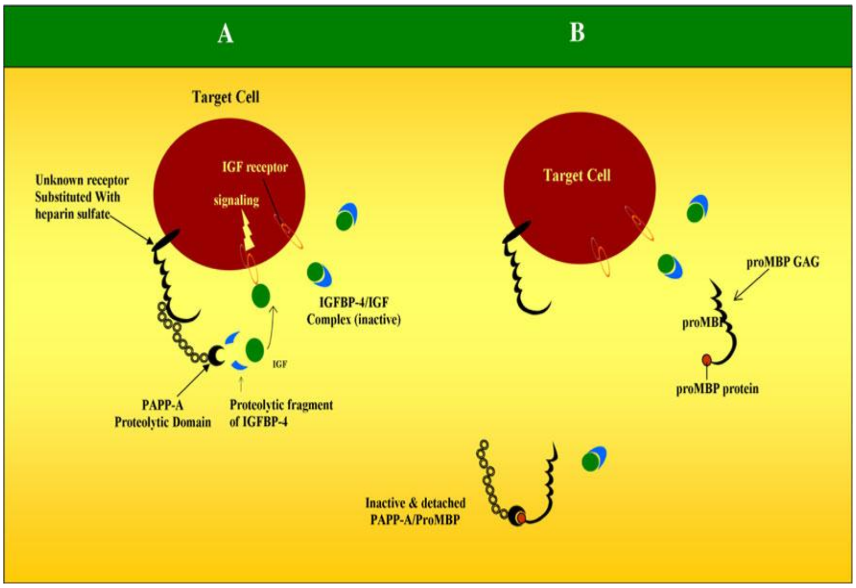


Figura 4. Actividad proteolítica de la PAPP-A en los seres humanos (Shiefa et al., 2013).

La disminución sérica placentaria de la PAPP-A en el primer trimestre de embarazo se asocia a muerte fetal, parto pretérmino, restricción en el crecimiento, diabetes, resultados peritales adversos y a la presencia de algunos síndromes genéticos (Peterson et al., 2008; Huyhn et al., 2014; Patil et al., 2014).

Diferentes estudios han demostrado que la concentración de PAPP-A está disminuida en fetos afectados con alguna anomalía cromosómica, su desviación de la normalidad disminuye conforme avanza la gestación, por lo tanto, la PAPP-A es un marcador bioquímico útil en el primer trimestre de gestación (Ong et al., 2000).

1.1.2.2. Gonadotropina coriónica humana (hCG).

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es una glicoproteína con un peso molecular de 39 kDa. Está compuesta por una cadena α y una cadena β unidas por fuerzas iónicas e hidrofóbicas (Figura 5). La subunidad alfa está compuesta por 92 aminoácidos y es idéntica a la que forman las hormonas Luteinizante (LH), Folículoestimulante (FSH), Hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la Corticotropina (ACTH). La subunidad β está compuesta de 145 aminoácidos, y es la que le confiere su actividad biológica (Figura 5). La hormona se sintetiza por el sincitio-trofoblasto de la placenta y se libera hacia el espacio intervelloso desde el cual pasa a la circulación materna. Es detectada en circulación materna a los 8 o 9 días post

concepción, al poco tiempo del anidamiento del blastocito sobre el endometrio. Los niveles se elevan rápidamente hasta un máximo entre las 10-12 semanas post-ovulación. Luego, los valores descienden hasta el término del embarazo. La medida de la concentración de la subunidad β en el suero matero es la que se utiliza para el cribado de cromosomopatías en el primer trimestre (Gerulewicz Vannini y Hernández-Andrade, 2007).

La subunidad α está codificada por un único gen del cromosoma 6, mientras que la subunidad β está codificada por 6 genes del cromosoma 19. La hormona posee en su superficie unos determinantes antigénicos que permiten su cuantificación mediante técnicas de inmunoensayo pudiéndose determinar los valores tanto de la molécula entera como los de cada uno de sus subunidades. La HCG intacta posee actividad biológica, por lo tanto, ninguna de las dos cadenas de la hormona por separado tiene acción biológica. La determinación de la β-hCG es más efectiva que la de la molécula completa (Gerulewicz Vannini y Hernández-Andrade, 2007). La sub–α no tiene la misma utilidad debido a su falta de especificidad (Hallahan et al., 2000).

La β-hCG libre tiene un papel muy importante en el mantenimiento de la gestación; su función más importante consiste en hacer crecer el cuerpo lúteo, que produce una gran cantidad de hormonas sexuales (progesterona y estrógenos), lo cual hace que el endometrio siga creciendo y acumulando nutrientes en vez de producirse la menstruación. Otra función es la diferenciación del cito al sincitio-trofoblasto, la esteroidogénesis adrenal fetal y placentaria y la síntesis de tetosterona por el testículo fetal.

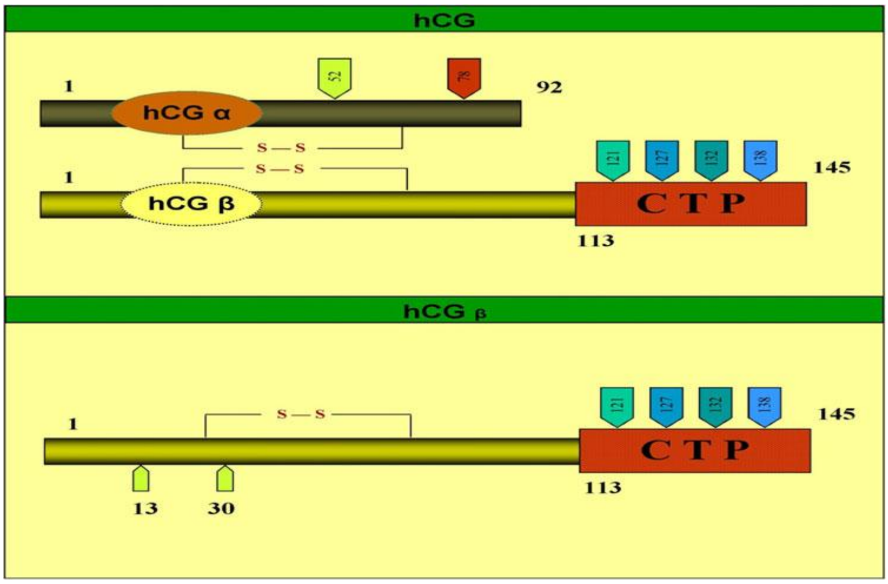


Figura 5. Estructura de hCG intacta y β-hCG (Shiefa et al., 2013).

1.1.3. La Translucencia Nucal como marcador ecográfico.

La translucencia nucal se define como el acúmulo subcutáneo de líquido detrás del cuello fetal en el primer trimestre del embarazo visible ecográficamente (Figura 6) (Nicolaides y Orlando). Numerosos estudios han demostrado que la translucencia nucal es una herramienta muy eficaz para la detección de la trisomía 21 y otras anormalidades cromosómicas en el primer trimestre de embarazo (Wright et al., 2008; Nicolaides, 2011; Karadzov-Orlic et al., 2012; Tahmasebpour et al., 2012; Salman Guraya., 2013).

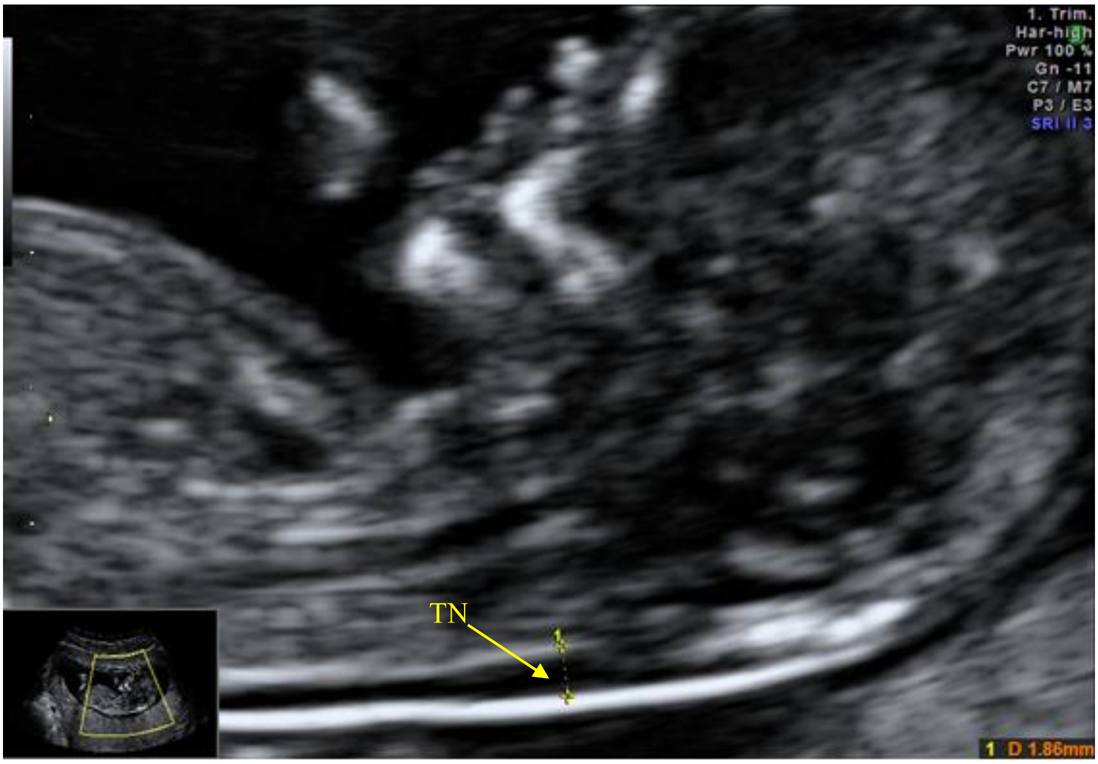


Figura 6. Translucencia nucal como se ve en el primer trimestre de gestación en un feto normal.

A principios de los años noventa se pudo visualizar mediante ecografía el exceso de piel, de individuos que presentaban síndrome de Down, como un aumento de la translucencia nucal entre las semanas 10 y 14 de gestación (Nicolaides et al., 1992). La translucencia nucal es un marcador muy sensible para la detección de anomalías cromosómicas en el primer trimestre de embarazo debido a que aproximadamente un 75% de fetos con trisomía 21 tienen aumentado el grosor de la translucencia nucal (Figura 7) (Ghaffari et al., 2012; Karadzov-Orlic et al., 2012; Berktold et al., 2013).

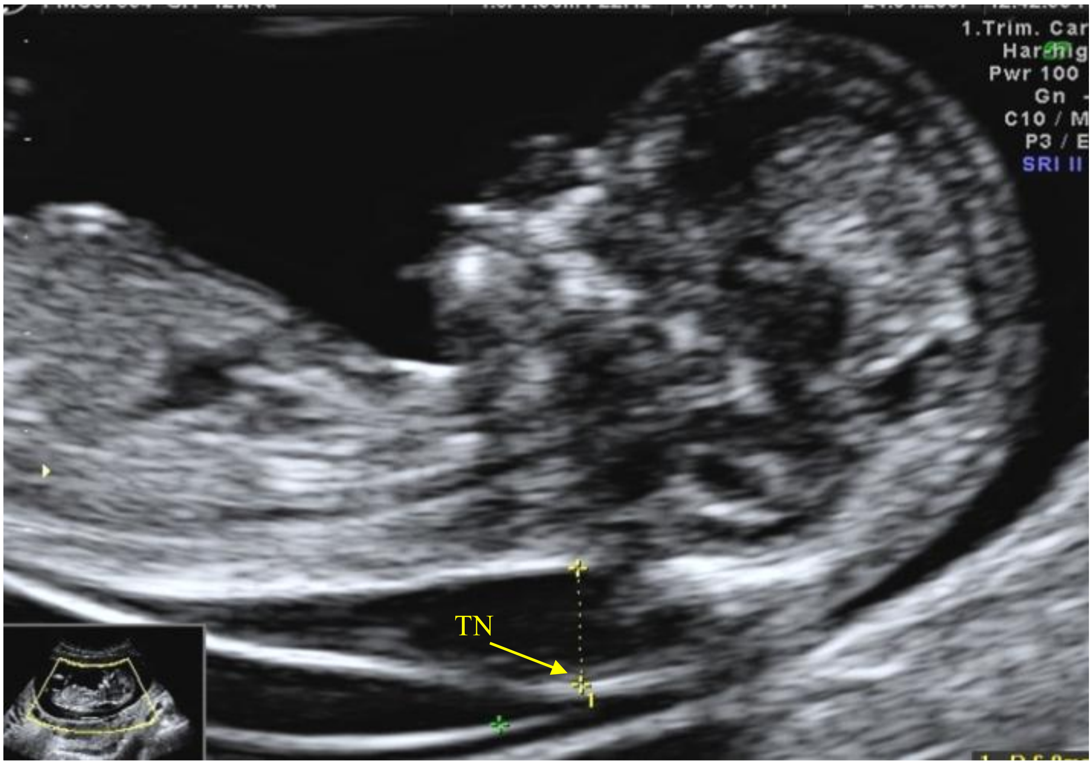


Figura 7. Aumento de la TN en un feto con síndrome de Down en el primer trimestre de gestación.

La asociación entre el aumento de la TN y los resultados adversos del embarazo en fetos cariotípicamente normales ha sido establecida por varios investigadores, ya que no solo es indicativo de riesgo de trisomía 21 sino que está asociada a un elevado porcentaje de otras anomalías cromosómicas como son el síndrome de Turner, malformaciones fetales, síndromes genéticos, muerte fetal, anomalías mayores del corazón y los grandes vasos (Tabla 7) (Michailidis et al., 2002; Nicolaides., 2004; Souka et al., 2005; Kagan et al., 2006; Kornacki et al., 2012; Sairam et al., 2012; Salman, 2013).

Tabla 7. Riesgo de aborto involuntario con una TN elevada (Salman, 2013)

Translucencia nucal (mm)	Muerte fetal (%)	Nacidos vivos sin anomalías (%)
3.5-4.4	2.7	70
4.5-5.4	3.4	50
5.6-6.4	10.1	30
>6.5	19.0	15

En la actualidad, la translucencia nucal aisladamente es el marcador más efectivo para la detección del síndrome de Down. En fetos sanos, la translucencia nucal aumenta con la LCC por lo que hay que tener en cuenta la edad gestacional para determinar si la TN está aumentada (Robinson y Fleming, 1975). Kagan y colaboradores (2008a) muestran las siguientes distribuciones de la TN en gestaciones con fetos con trisomía 21 (Figura 8).

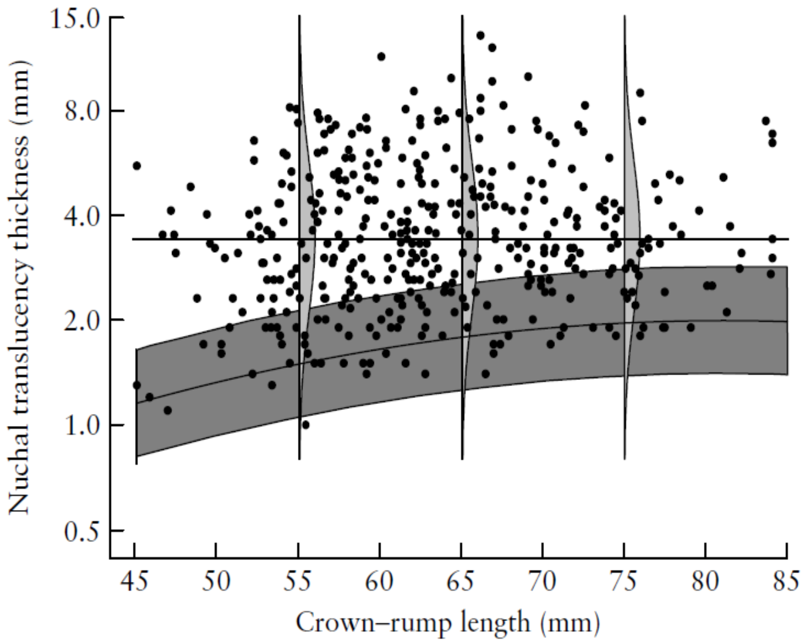


Figura 8. Distribución del grosor de la translucencia nucal con respecto a la longitud cráneo-caudal en fetos con trisomía 21(Kagan et al., 2008a).

La TN representa un cociente de probabilidad que se multiplica por el riesgo a priori, basados en las edades maternas y gestacional para calcular un nuevo riesgo de aneuploidía. Cuanto mayor es el grosor de la TN mayor será el cociente de probabilidad y por lo tanto, mayor será el riesgo, y al contrario. Conforme avanza el embarazo en el segundo trimestre la translucencia generalmente se resuelve, a veces en algunos casos

progresa a edema nucal o higroma quístico con o sin hidrops generalizado (Nicolaides y Orlando, 2004).

La Fetal Medicine Foundation (FMF) de Londres, Reino Unido, desarrolló pautas detalladas para obtener mediciones de la TN. La TN se mide entre las semanas 11 y $13^{+}6$ (la LCC mínima es de 45 mm y la máxima es de 84 mm). Las causas por las que se mide en la semana 11 es para tener la posibilidad de realizar la biopsia de vellosidad corial en caso que fuese necesario y debido a que muchas anomalías fetales mayores también son diagnosticadas en esta semana de gestación. Se elige la semana $13^{+}6$ como límite máximo, primero, para poder ofrecer a la paciente en el primer trimestre en caso de portar un feto afecto la posibilidad de interrumpir el embarazo, segundo porque después de la semana 14 el acúmulo excesivo de líquido nucal en fetos cromosómicamente anormales disminuye conforme avanzan las semanas de gestación y en tercer lugar debido a la posición que ocupa el feto, después de la semana 13 hace más difícil obtener una imagen apropiada para la medición de la TN.

Un aumento de la TN se describió por primera vez como una medida mayor que el percentil 95 (2.5 mm). Sin embargo, informes recientes han puesto de manifiesto, que resultados clínicamente adversos son mucho más comunes con una TN que supera un umbral establecido de 3.5 mm, una medida que, representa el percentil 99 (Souka et al., 2005).

Cuando la gestante presente una TN fetal por debajo del percentil 99 (3.5 mm), el riesgo individual de cada paciente resultará de la combinación de la edad materna, de los hallazgos ecográficos y de las concentraciones maternas de β-hCG libre y PAPP-A a las $11\text{-}13+^{6}$ semanas de gestación, lo que ayuda a tomar una decisión sobre sí se realiza o no la prueba invasiva. Únicamente con la TN la probabilidad de dar a luz a un recién nacido sin anomalías mayores es alrededor del 97% cuando la TN está por debajo del percentil 95, y del 93% cuando la TN está entre los percentiles 95 y 99. Un 1% de los embarazos presenta una TN mayor de 3.5 mm. El riesgo de anomalías cromosómicas aumenta conforme aumenta la TN en un 20% para una TN de 4.0 mm, al 33% para una TN de 5.0 mm, el 50% para una TN de 6.0 mm, y el 65% para una TN mayor o igual a 6.5 mm (Souka et al., 2009).

La mediana y el percentil 95 en un feto con LCC de 45 mm son de 1.2 y 2.1 mm y los valores respectivos con LCC de 84 mm son de 1.9 mm y 2.7 mm. El percentil 99 no se modifica de forma significativa en función de la LCC y oscila alrededor de 3.5. El aumento de la TN se define como un valor superior al percentil 95 y el término se utiliza de manera indistinta para una colección de líquido tabicada o no o para un incremento limitado al cuello o que afecte a todo el cuello o que afecte a todo el feto (Souka et al., 2009).

En alrededor del 1% de los embarazos se detecta una TN fetal superior a 3.5 mm. El riesgo de presentar defectos cromosómicos es muy elevado y aumenta desde alrededor del 20% en fetos con grosor de la TN de 4 mm, hasta el 33% en fetos con grosor de la TN de 5 mm, el 50% cuando el grosor de la TN alcanza 6 mm y el 65% cuando el grosor de la TN alcanza 6.5 mm o supera este valor. Kagan y colaboradores (2009b), muestran la distribución del grosor de la translucencia nucal con respecto a la longitud cráneo-caudal en fetos con trisomía 21 en los distintos percentiles (Souka et al., 2009) (Figura 9).

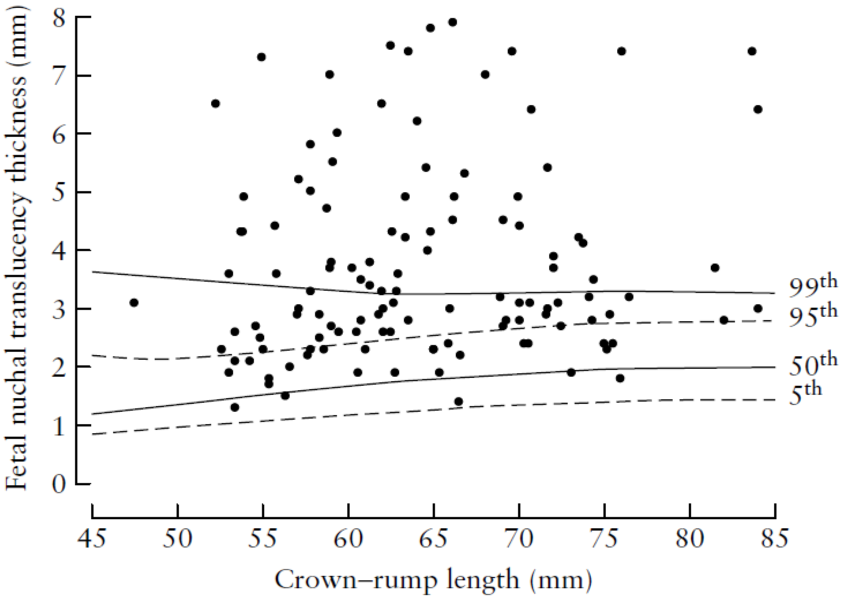


Figura 9. Distribución del grosor de la translucencia nucal con respecto a la LCC en fetos con trisomía 21. Por comparación, se muestran los percentiles 5, 50, 95 y 99 de la translucencia nucal de fetos euploides (Kagan et al., 2009b).

En consecuencia, la primera línea para el manejo de estos embarazos debe consistir en la evaluación del cariotipo fetal. En el grupo con cromosomas normales se debe llevar a cabo una ecografía detallada con ecocardiografía fetal entre las 14 y 16 semanas para determinar la evolución de la TN y para diagnosticar o excluir muchas anomalías fetales.

La persistencia del aumento de la TN, sin una etiología específica en la ecografía que se realiza entre las 14 y las 16 semanas, o su evolución a edema de nuca o hidrops fetal a las 20 semanas aumentan la posibilidad de que exista una infección congénita o un síndrome genético.

1.1.4. Marcadores ecográficos secundarios en el primer trimestre de gestación.

Gracias a los avances en estudio ecográfico en los últimos 20 años se ha observado que existen otros marcadores ecográficos importantes además de la translucencia nucal en el primer trimestre que son altamente sensibles y específicos para la detección de la trisomía 21 y otras anomalías cromosómicas. La adición de estos nuevos marcadores secundarios al screening combinando del primer trimestre mejora las tasas de detección en el 93-96% y disminuye la tasa de falsos positivos del 2.5% (Maiz et al., 2009; Kagan et al., 2010; Sonek y Nicolaides, 2010; Nicolaides, 2011). Son marcadores menores que también se asocian a una mayor incidencia de anomalías cromosómicas, como son la valoración del hueso nasal (HN), ductus venoso (DV) y regurgitación tricuspidea (RT) (Ghaffari et at., 2012). El examen preciso de estos marcadores requiere de operarios altamente cualificados y con experiencia para poder

incorporarlos a los protocolos de cribado del primer trimestre, así como de aparatos de ecografía de alta resolución.

La finalidad de estos marcadores secundarios es mejorar la precisión de la detección (Karadzov-Orlic et al., 2012), disminuyendo la práctica de procedimientos invasivos innecesarios no exentos de pérdida fetal en un 30% de los casos (Molina et al., 2012).

La ecografía se realiza en el primer trimestre entre las 11-13^{+}6 semanas de gestación, y tiene como misión además de fijar la edad gestacional a través del LCC, detectar las alteraciones estructurales y analizar los marcadores ecográficos de anomalías cromosómicas tempranamente y así poder ofrecer la realización de una prueba invasiva en el caso de diagnosticarse una anomalía fetal grave pudiendo adelantar la interrupción legal de la gestación. Actualmente, los marcadores ecográficos del primer trimestre son una herramienta de utilidad para seleccionar pacientes con riesgo de anomalías cromosómicas.

1.1.4.1. Hueso nasal.

En 1866, Langdon Down observó que una característica común de los pacientes con trisomía 21 era que presentaban poca elasticidad en la piel y su nariz era pequeña (Down, 1866). Estudios ecográficos posteriores dilucidaron que la ausencia del hueso nasal o hipoplasia nasal se asocia con el síndrome de Down (Figura 10). En la actualidad se valora como un nuevo marcador fuerte para la detección de la trisomía 21 y otras anomalías cromosómicas, que aumentaría la sensibilidad y especificidad mejorando sustancialmente el rendimiento del cribado combinado del primer trimestre (Cicero et al., 2001; McLennan et al., 2009; Masihi et al., 2014). Como marcador único tiene una tasa de detección de un 63.2% con una tasa de falsos positivos de un 3.4% (Molina et al., 2012).

Figura 10. Hueso nasal ausente

Figura 11. Hueso nasal presente.

El hueso nasal fetal puede visualizarse mediante ecografía a las 11–13^{+}6 semanas de gestación (Figura 11). En su estudio, Cicero y colaboradores concluyeron que su longitud no era lo realmente relevante para la detección de la trisomía 21 sino su presencia o ausencia, su longitud es más relevante posteriormente a las 14 semanas (Cicero et al., 2002; Orlandi et al., 2005).

Su inclusión en el cribado del primer trimestre combinado para la trisomía 21 logra una tasa de detección de un 90-97% con una tasa de falsos positivos del 2.5-5% (Nicolaides, 2004; Cicero et al., 2006).

Se han publicado numerosos estudios y todos coinciden en que el hueso nasal está ausente en el 60% de fetos que presentan trisomía 21 y tan solo en un 2-3% de estos casos en los que el hueso nasal está

ausente corresponde a fetos euploides. Para la trisomía 18 el hueso nasal está ausente en el 50% de los casos y en un 40% en fetos que presentan trisomía 13 (Sonek et at., 2003; Nicolaides, 2004; Kagan et al., 2009a; Ghaffari et al., 2012; Karadzov-Orlic et al., 2012).

La utilización del hueso nasal como marcador ecográfico secundario en el primer trimestre también tiene el inconveniente de su gran variabilidad étnica ya que su ausencia es mucho más frecuente en población negra o asiática que en caucasianos (Suwanrath et al., 2013). Por lo tanto, a la hora de calcular cocientes de probabilidad en el cribado de la trisomía 21, deben realizarse ajustes que tengan en cuenta estos factores de confusión (Cicero et al., 2003a).

1.1.4.2. Ductus venoso.

El ductus venoso es un vaso único que mide de 2 a 3 mm a las 11-13+^{6} semanas de gestación. Su función es dirigir la sangre oxigenada desde la vena umbilical hacia la circulación cardiaca y cerebral. Presenta una morfología característica, con tres ondas típicas de todos los vasos pulsátiles (Figura 12): sístole ventricular (S), diástole ventricular (D) y sístole auricular (A). La onda del ductus tiene una forma característica, presenta una alta velocidad durante la sístole y diástole ventricular y un flujo positivo (normal) durante la sístole auricular. La onda-a es reversa y se considera como anormal (Figura 13). La función del ductus venoso es dirigir la sangre oxigenada al cerebro fetal.

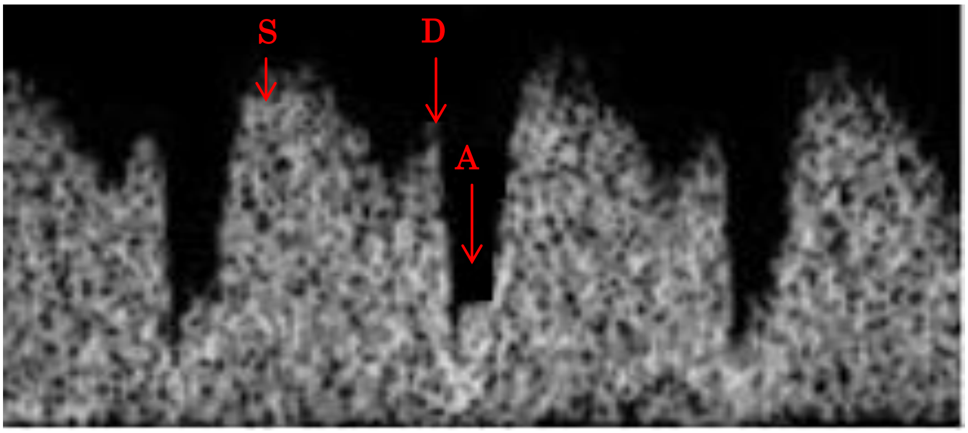


Figura 12. Componentes de la onda de velocidad de flujo del Ductus Venoso.

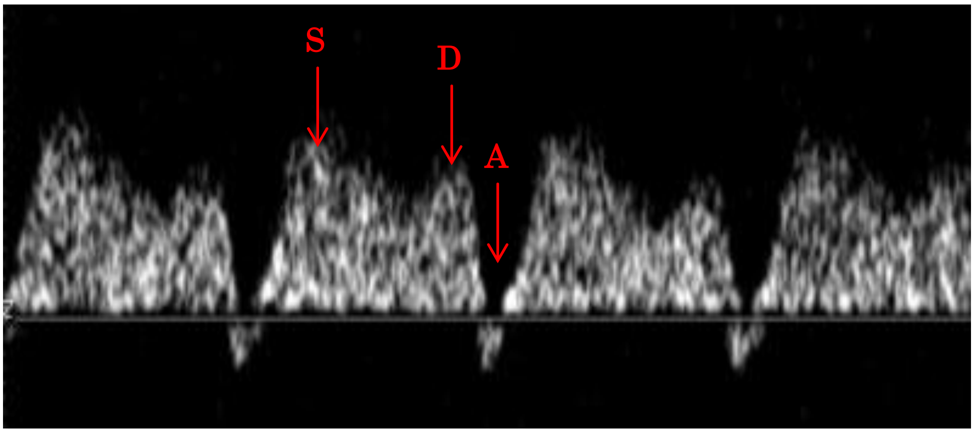


Figura 13. Flujo reverso en el ductus venoso en un feto con trisomía 21 a las 12 semanas de gestación (Maiz et al., 2009)

La obtención de un Doppler adecuado de ductus no es fácil, su onda de flujo Doppler puede ser confundida con la de las venas hepáticas o vena cava inferior y considerarse erróneamente alterado. Por esto debe ser realizado por personas cualificadas.

La evaluación del conducto de flujo venoso mejora el rendimiento de la detección de anomalías cromosómicas en el primer trimestre. Patrones de flujo sanguíneo inapropiado del doppler del ductus venoso en el primer trimestre corresponden a un mayor riesgo de anomalías cromosómicas (Florjański et al., 2013). La onda-a reversa del ductus se observa en el 3% de los fetos euploides y en aproximadamente 65%, 55%, 55% y 75% de los fetos con trisomías 21, 18, 13 y síndrome de Turner respectivamente (Maiz et al., 2009; Kagan et al., 2010; Molina et al., 2012; Karadzov-Orlic et al., 2012; Ghaffari et al., 2012). Además de asociarse con anomalías cromosómicas, el flujo anormal del ductus se asocia con defectos cardiacos y muerte fetal (Murta et al., 2002; Toyama et al., 2004).

1.1.4.3. Regurgitación tricuspídea.

Hablamos de regurgitación cuando el flujo sanguíneo va en dirección opuesta a la normal, es decir, del ventrículo a la aurícula a través de las válvulas. La válvula tricuspidea separa el ventrículo derecho de la aurícula derecha y cuando el flujo sanguíneo va en dirección opuesta a la normal hablamos de regurgitación tricuspídea. El flujo sanguíneo a través de la válvula tricuspídea produce una onda característica que

puede ser normal o anormal (regurgitación) (Figura 14). Es un marcador de defectos cardíacos y está muy asociada con anomalías cromosómicas, especialmente la trisomía 21.

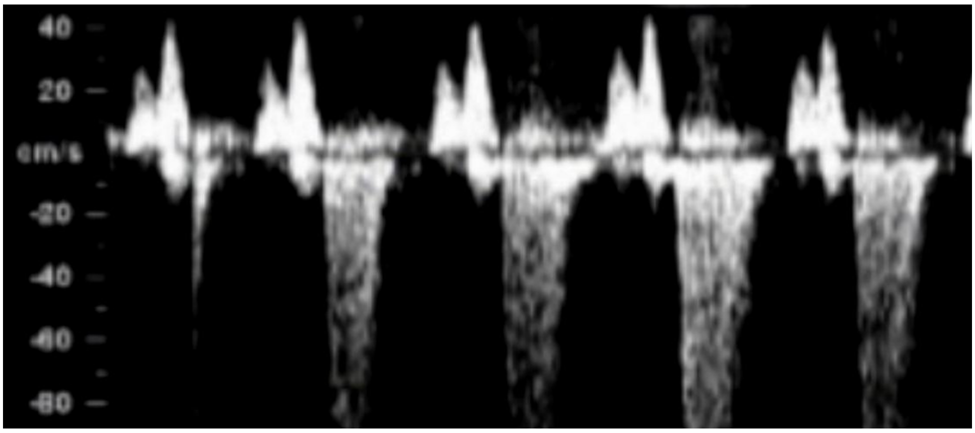


Figura 14. Regurgitación tricuspídea en el primer trimestre de gestación.

A las 11-13^{+6} semanas se encuentra regurgitación tricuspídea en el 4.4% de fetos cromosómicamente normales y en aproximadamente el 56%, 30%, 30% de fetos con trisomía 21, 18 y 13 respectivamente (Kagan et al., 2010; Molina et al., 2012; Ghaffari et al., 2012; Karadzov-Orlic et al., 2012). Aun así, la gran mayoría de fetos con onda anormal son normales y los embarazos, se producen con resultados favorables (Falcon et al., 2006; Kagan et al., 2009c).

En su estudio, Fabiola y colaboradores examinaron la válvula triscúpide en 718 pacientes y encontraron regurgitación tricuspídea en un 8.5% de fetos cromosómicamente normales, un 65.1% de fetos con trisomía 21 y aproximadamente el 50% con trisomía 18 o 13 (Faiola et al., 2005). El estudio también ha demostrado que, en primer lugar, la prevalencia de la RT disminuye con la gestación, aumenta con la TN y es sustancialmente mayor en aquellos que presentan un defecto cardiaco. En las semanas de gestación 11-13^{+6}, hay una alta asociación entre la RT y la trisomía 21 así como otros defectos cromosómicos. La prevalencia de la RT aumenta con la TN fetal y es mayor en los que tienen un defecto cardíaco.

Un ecografista fetal experimentado puede obtener vistas adecuadas para la evaluación de la válvula tricúspide en más del 95% de los casos a las 11-13^{+}6 semanas de gestación (Falcon et al., 2006).

1.2. CÁLCULO DE RIESGO PRENATAL DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS.

La mayoría de las cromosomopatías aumentan con la edad materna siendo más significativo a partir de los 35 años según el metaanálisis publicado en 1987 por Cuckle, Wald y Thompson (Cuckle et al., 1987) a través del cual pudo establecerse el riesgo específico para trisomía 21 de los 18 a los 50 años de edad materna. La probabilidad que presenta una embarazada de tener un feto afectado por una anomalía cromosómica depende de la edad materna y edad gestacional y se le denomina **–riesgo a priori**”. Este se multiplica por una serie de cocientes de probabilidad que dependen del resultado de las pruebas de cribado que se realicen durante la gestación. En el caso del síndrome de Down el riesgo de tener un bebé afecto aumenta con la edad materna y disminuye a medida que la gestación avanza debido a que los fetos con defectos cromosómicos tienen un riesgo elevado de muerte intraútero.

Los valores obtenidos de los marcadores bioquímicos se expresan en múltiplos de la mediana (MoM) para conseguir un mejor ajuste a una curva de Gauss debido a que estos marcadores siguen distribuciones gaussianas. Para el cálculo de los MoM hay que conocer las medianas de cada marcador calculada a partir de un mínimo de 100 muestras de gestantes no portadoras de fetos aneuploides para cada momento de la gestación en el que habitualmente se determinan. Con estas medianas calculadas en cada semana de gestación se obtiene una curva de regresión que se expresa matemáticamente mediante funciones polinómicas. Para el cálculo de los MoM de cada marcador se divide el valor obtenido del marcador entre el valor de la mediana calculada para la edad gestacional. Para verificar que el cálculo de las medianas y la conversión a MoM se han realizado correctamente la mediana de los MoM para una muestra amplia de gestantes debe ser igual a 1. La transformación en MoM de los parámetros bioquímicos del laboratorio se realiza mediante un programa informático.

Entendemos como marcador de aneuploidía aquel que presenta diferencias cuantitativas o cualitativas estadísticamente significativas entre los fetos afectados por una anomalía cromosómica y aquellos que no lo están (Figura 15).

El cociente de probabilidad de una determinada medida ecográfica o bioquímica se calcula según la distribución poblacional gaussiana dividiendo el porcentaje de fetos cromosómicamente anormales entre el porcentaje de fetos cromosómicamente normales. El cociente de probabilidad es una forma de describir el comportamiento de una prueba de cribado y contiene la misma información que la sensibilidad-especificidad por lo que puede utilizarse para estimar la probabilidad de afectación a partir del resultado de dicha prueba (Programa para el screening de síndrome de Down, 2001). Cada uno de estos marcadores ecográficos está asociado a un cociente de probabilidad que puede multiplicarse por el riesgo a priori para calcular el nuevo riesgo.

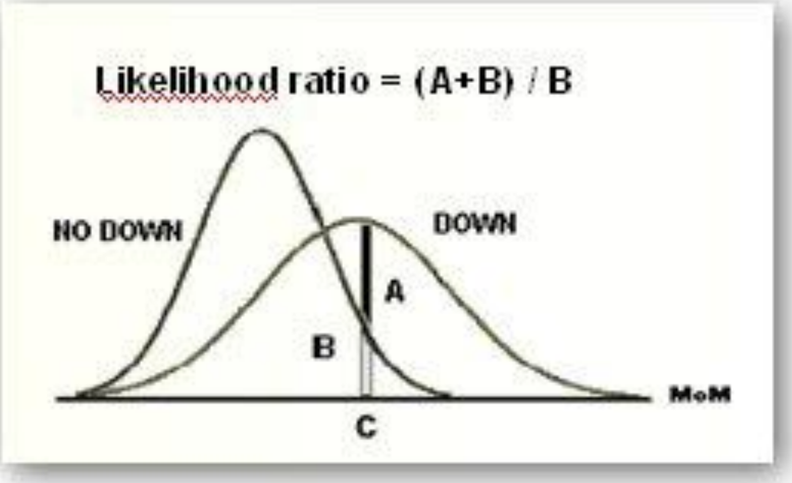


Figura 15. Proporción de casos afectados y no afectados por encima de cierto límite representan la tasa de detección y tasa de falsos positivos (Programa para el screening de síndrome de Down, 2001).

El riesgo a priori se multiplica por el cociente de probabilidad de cada prueba bioquímica o ecográfica para calcular un nuevo riesgo a posteriori. Este cribado secuencial requiere que las diferentes pruebas sean independientes entre sí y se expresa como un índice de probabilidad de 1 entre el resultado de dicho producto (Nicolaides, 2011).

Existen unos márgenes relativamente estrechos para los que la sensibilidad y especificidad son óptimos y, a partir de los cuales, para obtener pequeños aumentos en la capacidad de detección son necesarios importantes incrementos en la tasa de falsos

positivos. Estos márgenes se pueden calcular mediante las curvas ROC (Receiver Operating Characteristic Curve o curva de características operativas) que se construyen representando la sensibilidad (verdaderos positivos) en el eje de ordenadas y especificidad (falsos positivos) en el eje de abscisas así, para una prueba en concreto, se puede calcular la sensibilidad y especificidad con cada punto de corte.

1.3. ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS.

Un porcentaje elevado de nacimientos presenta alguna anomalía en los cromosomas, aproximadamente entre en un 0.6%-1% de los nacidos vivos y en un 6% de los nacidos muertos (SEGO). Más de un 50% de mujeres embarazas que sufren un aborto espontáneo en el primer trimestre son producto de una anomalía cromosómica. Estas anomalías se originan por alteración en el número o estructura de los cromosomas constituyendo un grupo importante de defectos congénitos. Las anomalías cromosómicas se clasifican en numéricas o estructurales y afectan tanto a los cromosomas autosómicos como sexuales (Nussbaum et al., 2008; Jorde et al., 2012).

1.3.1. Anomalías cromosómicas estructurales.

Las anomalías estructurales son aquellas que afectan a la estructura de los cromosomas, se producen como consecuencia de roturas cromosómicas seguidas de reconstitución en una combinación anómala. Este tipo de anomalías pueden ser equilibradas (balanceadas) si mantienen el complemento cromosómico normal y desequilibradas (desbalanceadas) si existe pérdida o ganancia de material (Nussbaum et al., 2008; Jorde et al., 2012).

Las anomalías cromosómicas estructurales equilibradas (Figura 16) como las translocaciones e inversiones carecen de manifestaciones fenotípicas, debido a que presentan todo el material cromosómico aunque este organizado de forma diferente. Los individuos portadores de anomalías equilibradas son individuos sanos pero tienen una mayor probabilidad de transmitir a sus hijos una anomalía cromosómica, dando lugar a cariotipos anormales desequilibrados (Figura 17) (Jorde et al., 2012).

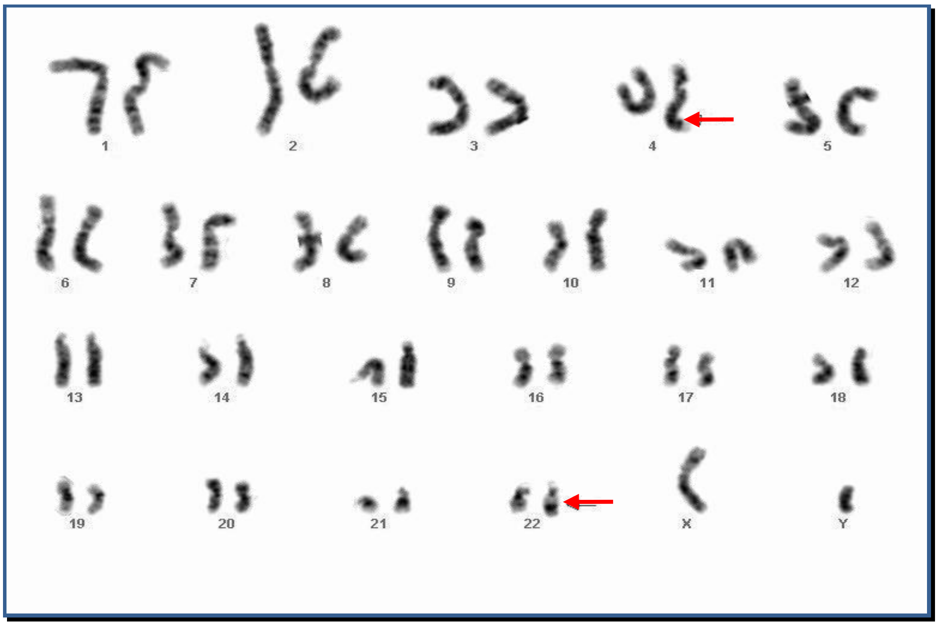


Figura 16. Cariotipo que presenta una población celular uniforme de 46 cromosomas de sexo masculino. Se observa una translocación recíproca entre los brazos largos de un cromosoma 4, con el punto de rotura q33, y los brazos largos de un cromosoma 22, con un punto de rotura q13.1. Cromosoma 22q13. Translocación aparentemente equilibrada 4;22. Fórmula cromosómica: 46, XY t(4;22)(q33;q13.1).

Las translocaciones robertsonianas implican dos cromosomas acrocéntricos que se fusionan cerca de sus regiones centroméricas y pierden los brazos cortos que no portan información genética esencial (dos cromosomas no homólogos y los brazos largos se unen por el centrómero formando un cromosoma único). Este tipo de translocación se limita a los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22. El cariotipo equilibrado resultante tiene 45 cromosomas con el cromosoma translocado que, de hecho, está compuesto por los brazos largos de los cromosomas. Hay dos relativamente frecuentes que ocurren entre los cromosomas 14 y 21, el brazo largo del cromosoma 21 y el brazo corto del cromosoma 14 intercambian sus posiciones (13q14q y 14q21q). A pesar de que un portador de una translocación robertsoniana sea fenotípicamente normal existe el riesgo de que produzca gametos desequilibrados y por tanto, de que tenga descendencia anormal. Cuando el portador de una translocación produce gametos, el cromosoma de translocación puede segregarse de tres maneras diferentes (Pierce, 2009):

1. El cromosoma de translocación puede separarse de los cromosomas 14 y 21 normales en la anafase I de la meiosis (figura 17a). En este tipo de

segregación la mitad de los gametos tendrá el cromosoma de tranlocación y ninguna otra copia de los cromosomas 14 y 21: la fusión de este tipo de gameto con un gameto normal dará origen a un portador de translocación. La otra mitad de los gametos producidos por este tipo de segregación será normal, cada uno con una única copia de los cromosomas 21 y 14, por lo que producirán una descendencia normal.

2. El cromosoma de translocación puede separarse del cromosoma 14 y pasar a la misma célula con el cromosoma 21 normal (figura 17b). Este tipo de segregación produce sólo gametos anormales: la mitad tendrá dos copias funcionales del cromosoma 21 (una normal y otra unida al cromosoma 14) y la otra mitad carecerá del cromosoma 21. Los gametos que poseen las dos copias funcionales de cromosoma 21 producirán descendencia con el síndrome de Down: los gametos que carecen del cromosoma 21 producirán descendencia con el síndrome de Dow; los gametos que carecen del cromosoma 21 producirán cigotos con monosomía 21 y se abortarán en forman espontánea.

3. En el tercer tipo de segregación, el cromosoma de translocación y la copia normal del cromosoma 14 se segregan juntos y el cromosoma 21 se segrega por separado (figura 17c). Se supone que este patrón es poco frecuente debido a que ambos centrómeros provienen del cromosoma 14 y, por lo general, se separan uno del otro. En cualquiera de los casos todos los gametos producidos mediante este proceso son anormales: una mitad producen monosomía 14 y la otra mitad trisomía 14 y en estos casos abortan de manera espontánea. Así, sólo tres de los seis tipos de gametos que pueden ser producidos por el portador de una translocación darán como resultado el nacimiento de un niño y teóricamente, estos gametos aparecerán con la misma frecuencia. Un tercio de las descendencia del portador de una translocación debería ser portador de una translocación como sus progenitores, un tercio debería presentar el síndrome de Down y un tercio debería ser normal, sin embargo, en realidad menos de un tercio de los niños nacidos portadores de translocación presentan síndrome de Down, lo que sugiere que algunos

de los embriones con síndrome de Down abortan de modo espontaneo (Figura 17) (Pierce, 2009).

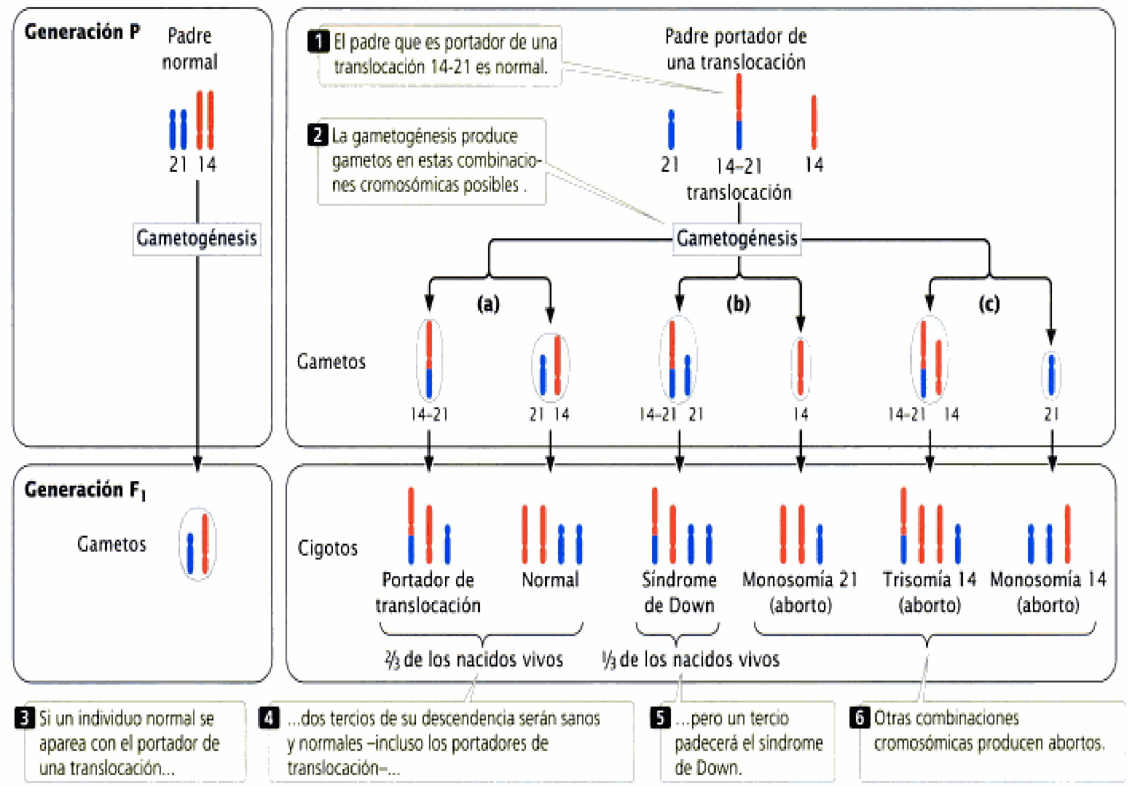


Figura 17. Portadores de translocaciones tienen un mayor riesgo para la producción de los niños con síndrome de Down (Pierce, 2009).

Las anomalías estructurales desequilibradas son: las deleciones, duplicaciones, cromosomas marcadores y en anillo, isocromosomas, cromosomas dicéntricos, cromosomas acéntricos y anillos. El fenotipo en este tipo de reordenamientos suele ser anormal. La duplicación de un cromosoma origina una trisomía parcial mientras que una deleción produce una monosomía parcial. Cualquier cambio que distorsione el equilibrio normal de genes funcionales puede ocasionar un desarrollo anormal. (Nussbaum et al., 2008).

1.3.2. Anomalías cromosómicas numéricas.

La **aneuploidía** es la anomalía cromosómica numérica más común en los seres humanos y la principal causa genética de defectos congénitos de nacimiento y abortos espontáneos. Consiste en una modificación del número normal de cromosomas ya sea por la pérdida o ganancia de alguno de los cromosomas. Se dice trisomía (2n+1) cuando

existen tres copias de un cromosoma del mismo par en lugar de dos que es lo normal, en caso de una monosomía (2n-1) existe una sola copia del cromosoma. La nulisomía es la pérdida de ambos miembros de un par de cromosomas (2n-2) y la tetrasomía es la ganancia de dos cromosomas homólogos (2n+2) (Nussbaum et al., 2008). La poliploidía es la presencia de un grupo completo de cromosomas extras en una célula (Figura 18).

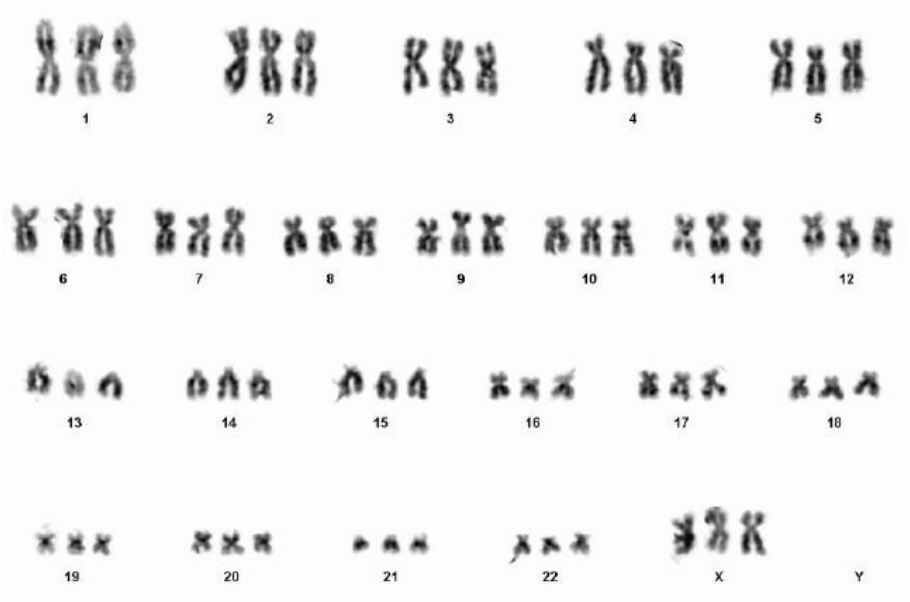


Figura 18. Cariotipo que presenta una población celular uniforme de 69 cromosomas de sexo femenino, observándose triploidía. Fórmula cromosómica: 69,XXX

Las aneuploidías más comunes son las relacionadas con los cromosomas sexuales y son el síndrome de Turner y el síndrome de Klinefelter. Las aneuploidías autosómicas son menos frecuentes tal vez porque no existe un mecanismo de compensación de la dosis en los cromosomas autosómicos. La mayoría sufren un aborto espontáneo a excepción de cromosomas pequeños como es el caso del cromosoma 21 (Pierce, 2009).

La aneuploidia autosómica más común es la del cromosoma 21 también llamado síndrome de Down. Se sabe que el cromosoma 21 es un cromosoma pequeño y pobre en genes y que posee una elevada proporción de secuencias AT en relación a secuencias GC. La detección del síndrome de Down es objetivo prioritario en el diagnóstico prenatal de cromosomopatías dado el retraso mental que conlleva y a su elevada supervivencia postnatal. Le sigue en frecuencia la aneuploidía del cromosoma 18 y 13.

Niña con Trisomía 21 (Weijerman et al., 2010).

1.3.2.1. Trisomía 21 (Síndrome de Down).

En al año 1866, John Langdon Down describe por primera vez clínicamente el síndrome de Down aunque no olvidemos que no se conocían aún las bases genéticas y moleculares que lo originaban. Fue Jerome Lejeune un genetista Francés quien en 1959 asoció el síndrome de Down con una alteración cromosómica al descubrir un cromosoma adicional en el par 21 en células de individuos afectos, es la aneuploidía autosómica más común compatible con la vida que afecta a uno de cada 750 nacidos vivos (Roper y Reeves, 2006). Debido a su alta incidencia se ha adoptado un programa de cribado en todos los hospitales para su detección precoz. La edad es un factor de riesgo muy importante (Strauss et al., 2013) siendo la incidencia mucho mayor a partir de los 35 o más años (Roizen y Patterson, 2003; Morris et al., 2003; Wiseman et al., 2009). El síndrome de Down tiene una letalidad de un 30-40%. La longevidad no es muy elevada y su expectativa de vida es alrededor de 40 años (Stewart, 2004) aunque en las últimas décadas ha aumentado considerablemente la esperanza de vida de los niños con síndrome de Down gracias a la atención médica y mejora en los tratamientos.

El síndrome de Down es el resultado de una triplicación de una banda del cromosoma 21 (Hsa21) llamada 21q22, esta triplicación puede ser total, debido a la presencia de un cromosoma extra 21 completo (Figura 19) o parcial como consecuencia de una translocación (Figura 20) (Patterson, 2009). El fenotipo del síndrome de Down presenta una expresividad y una penetrancia muy variable en cada individuo (Letourneau y Antonarakis, 2012).

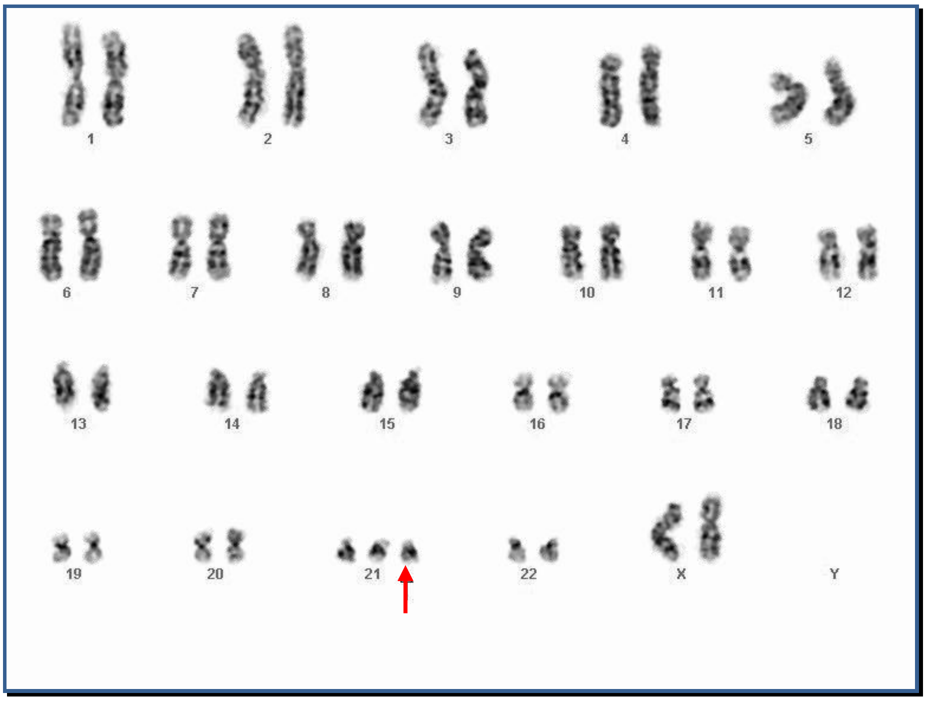


Figura 19. Cariotipo que presenta una trisomía 21 completa. El síndrome de Down se caracteriza por presentar tres copias del cromosoma 21.

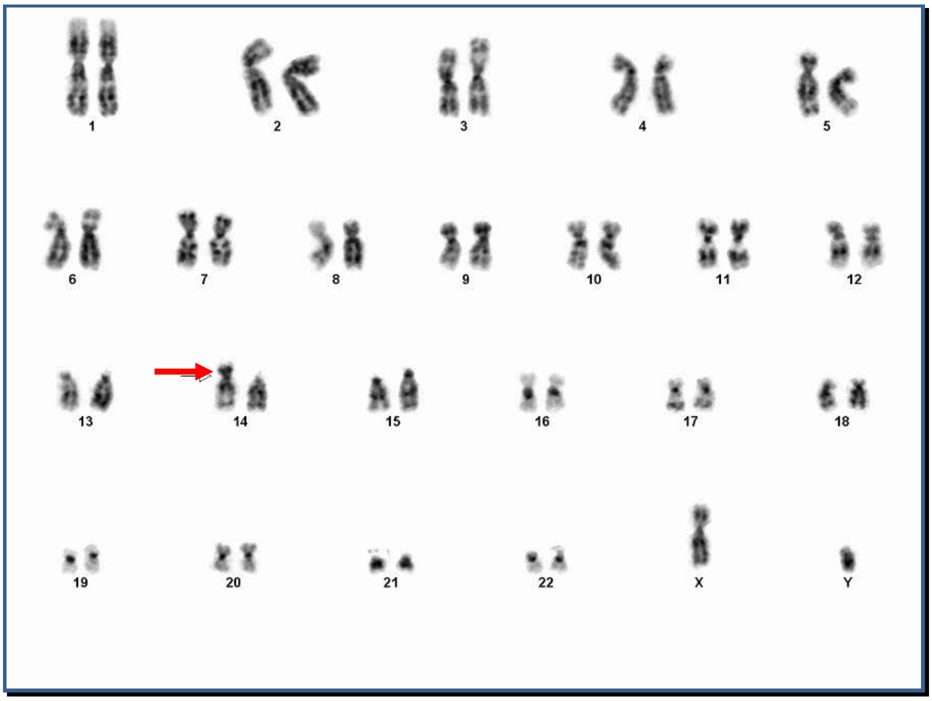


Figura 20. Cariotipo que presenta una trisomía 21 por translocación robertsoniana no balanceada 14;21.

El Síndrome de Down ocurre como consecuencia de tres mecanismos diferentes:

- 95% de los casos es originado por el fenómeno de la no disyunción meiótica presentando un cromosoma extra en el par 21.
- 3%-5% es debido a una translocación robertsoniana entre los cromosomas 14 y 21.
- 2-3% se debe al mosaicismo cromosómico representando una forma menos severa.

Para diagnosticar el síndrome de Down basta con un análisis de los cromosomas a través de la tecnología QF-PCR y cariotipado de las células del feto obtenidas a través de pruebas invasivas cuando existan factores de riesgo asociados.

Gracias a la identificación y caracterización de los genes del cromosoma humano 21 (Hsa 21) se pudo comprender mejor la base molecular del síndrome de Down. Los primeros estudios argumentaban que existía una región crítica del Síndrome de Down ―DSCR" (Korenberg et al., 1991; Delabar et al., 1993), un pequeño segmento del Hsa21 que contiene los genes responsables de muchas de las características del síndrome de Down, esta teoría dominó el campo de la investigación del síndrome de Down durante muchos años. Esta región se extiende unas 5.4 Mb conteniendo 33 genes y se le asocian muchas de las características fenotípicas del síndrome de Down como son la talla baja, el retraso metal, cara plana y la hipotonía muscular (Korenberg, 1991; Nikolaienko et al., 2005; Roper y Reeves, 2006; Lyle et al., 2009).

Esta teoría argumenta que los genes de esta región son suficientes para producir los rasgos fenotípicos del síndrome de Down cuando existe un cromosoma extra completo en el par 21. Años más tarde, se analizaron casos de trisomía parcial, realizando un estudio genético más exhaustivo, demostrándose que existen regiones diferentes del cromosoma 21 que contribuyen a sus características fenotípicas. Esto contradice la hipótesis de la región crítica del síndrome de Down (DSCR) como única responsable de las características fenotípicas de este síndrome. Se ha llegado a la conclusión de que el síndrome de Down es una enfermedad genética muy compleja en la que intervienen multitud de genes (Korbel et al., 2009; Lyle et al., 2009).

Se han descrito el papel de muchos genes dentro de la región crítica del síndrome de Down, los genes DSCR1 y DYRK1A han sido los más estudiados por presentar una actividad sinérgica entre ambos. El gen DYRK1A codifica la proteína Dyrk1A, que es una enzima con funciones proteín quinasa, incorporando grupos fosfato a distintas proteínas que se encuentra tanto en el citoplama como en el núcleo de las células, por ello participa en una gran variedad de funciones fisiológicas. Una de las proteínas a la que fosforila es a un factor de transcripción llamado NFAT (Factor Nuclear de células T Activadas), que al ser fosforilado no puede penetrar en el núcleo de la célula o es expulsado de él, no pudiendo ejercer su acción facilitadora de la transcripción para sintetizar proteínas. La actividad fosforilante de Dyrk1A es compensada o equilibrada por la acción contrapuesta de la calcineurina, que es una fosfatasa y como tal sustrae grupos fosfato, estableciéndose un equilibrio entre ambas. La calcineurina es inhibida por la calcipresina 1, una proteína codificada por el gen DSCR1, eso rompe el equilibrio porque si la calcineurina esta inhibida, se incrementará la actividad fosforilante de la quinasa DYRK1A, y con ello habrá una mayor fosforilación del NFAT y disminuirá su capacidad de mantenerse en el núcleo y no podrá ejercer su acción transcriptora para la síntesis de ciertas proteínas. Ese desequilibrio puede alterar gravemente los procesos de desarrollo en las células de ciertos órganos. En definitiva, el gen DSCR1 ayuda a, o sinergiza con, el gen *DYRK1A* ya que consigue, por mecanismos distintos, el mismo efecto final: favorecer la fosforilación del NFAT. Si, como ocurre en la trisomía 21, hay sobreexpresión de esos dos genes, el resultado final será una hipertrofia del proceso de fosforilación y, por consiguiente, una inhibición excesiva en la actividad transcripcional del NFAT (Arron et al., 2006), que podría contribuir tanto a las anomalías neuronales como cardíacas en el síndrome de Down. Los ratones que mediante ingeniería genética expresaban DYRKIA y DSCR1 en niveles elevados tenían un desarrollo del corazón anormal similar a los problemas cardiacos congénitos que se observan en los individuos con síndrome de Down (Belichenko et al., 2007; Wiseman et al., 2009).

Olson y colaboradores (2004), realizaron un estudio con ratones para determinar si los genes dentro de la región crítica eran los únicos responsables de las características del síndrome de Down. Demostraron que el síndrome de Down, no se debe a un único gen sino a una interacción entre múltiples genes. Estos genes se encuentran afectados

interactuando de manera compleja cuando el cromosoma 21 presenta un cromosoma extra.

La presentación fenotípica de las características de los individuos con síndrome de Down es muy compleja y diferente en cada uno de ellos. El principal problema del síndrome de Down es el retraso mental, su coeficiente intelectual suele estar en 50. Otras características comunes son: rasgos faciales muy característicos, cuello corto y la piel de la nuca abundante. La estatura de los adultos está alrededor de los 150 cm. Nariz y orejas con implantación baja, hendiduras palpebrales inclinadas hacia arriba, pabellones auriculares pequeños. Manos cortas, anchas y aproximadamente un 50% presentan un pliegue flexor marcado en sus palmas (pliegue simiano) y meñique incurvado (clinodactilia) (Nussbaum et al., 2008).

Los individuos con síndrome de Down se caracterizan por presentar un deterioro cognitivo conforme avanza la edad de la persona de un grupo de neuronas localizadas en el telencéfalo. A estas neuronas se les denomina neuronas colinérgicas del telencéfalo basal (NCTB). Estas neuronas envían sus prolonaciones o axones para conectar y activar a otras que se encuentran en el hipocampo contribuyendo a mantener algunos apectos de la actividad cognitiva, como puede ser la memoria semántica y concretamente la episódica (Salehi et al., 2006). La mayoría de personas con síndrome de Down desarrollan a una edad joven la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer (Costa, 2012), lo que ocurre es una degeneración progresiva de las neuronas NCTB, se piensa que es debido a la trisomía de los genes del cromosoma 21, al presentar un exceso de actividad de algunos de los genes de este cromosoma 21. Uno de los genes candidatos para el desarrollo de esta neuropatología temprana es el gen APP, responsable de la formación de la proteína pre-amiloide (APP), esta proteína origina otra proteína la β-amiloide (Aβ) que es el principal constituyente de las placas de amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Tanto mutaciones como duplicaciones del gen APP se asocian al inicio temprano de dicha enfermedad (Salehi et al., 2006; Shi et al., 2012).

La hipotonía muscular es otra de las características que presentan los individuos con síndrome de Down. Se han estudiado dos regiones del Hsa21 que cuando están

presentes en tres copias provocan este problema, es una región de 37.4 Mb a 38.4 Mb y una segunda región de 46.5 Mb (Lyle et al., 2009).

Una de las causas de la alta morbilidad y mortalidad infantil en personas con síndrome de Down es que tienen un riesgo elevado de padecer ciertas enfermedades. Los problemas respiratorios son responsables de la mayor parte de la morbilidad y hospitalización en niños con síndrome de Down así como los defectos congénitos del tracto gastrointestinal que están presentes en el 4-10% de estos niños y desempeñan un papel importante en la morbilidad durante el primer año de vida. Entre un 40-61% presentan malformaciones cardiacas congénitas (Freeman et al., 2008). La malformación cardíaca más común es el defecto del septo auriculoventricular (Barlow et al., 2001). Existe una región crítica cardiaca de 1.77 Mb desde el gen DSCAM (Down Syndrome Cell Adhesión Molecule) a ZNF295 responsable de los defectos cardiacos (Korbel et al., 2009).

Las personas con síndrome de Down tienen un riesgo 18 veces mayor de desarrollar leucemia en comparación con la población que no presenta esta trisomía (Wechsler et al., 2002; Bercovich et al., 2008).

Un estudio reciente publicado en Nature por Letourneau y colaboradores (2014) argumentaron que el cromosoma extra presente en el síndrome de Down puede afectar a la regulación transcripcional más allá del propio cromosoma 21. En este artículo estudiaron el caso de un par de gemelos monozigóticos, en los cuales uno de los gemelos presentaba un cromosoma 21 adicional y el otro no, una inusual circunstancia ha permitido estudiar de forma aislada los efectos del síndrome de Down en la expresión génica en dos individuos genéticamente idénticos y que como resultado han descubierto que la trisomía 21 puede afectar a otros cromosomas.

Los investigadores han descubierto que en el gemelo con síndrome de Down, los genes localizados en zonas del genoma de expresión normalmente elevada en individuos que no presentan síndrome de Down, presentaban una expresión reducida, mientras que los genes en territorios que normalmente tienen una expresión reducida, mostraban una mayor expresión. Esto implica que en el síndrome de Down hay efectos sobre la respuesta a la expresión génica que afectan a los demás cromosomas, en contra

de la percepción simplificada mantenida durante mucho tiempo de que el cromosoma extra 21 era el único responsable de los síntomas.

Los investigadores examinaron las secuencias de ARN mensajero (ARNm) en fibroblastos de la piel de ambos gemelos y encontraron 182 genes que variaron en los niveles de expresión entre los gemelos, incluyendo algunos que codifican proteínas. La expresión diferencial entre los gemelos se organiza en dominios a lo largo de todos los cromosomas. Llamaron a este efecto sobre la expresión de determinados territorios génicos ”disfunción de dominios de la expresión génica”, o GEDDs y sugirieron que estos GEDDs interfieren con la habilidad de las células para regular la transcripción, posiblemente contribuyendo con copias adicionales de los genes que intervienen en la regulación génica.

Cuando los investigadores estudiaron estos dominios de la expresión Génica en individuos no relacionados genéticamente, encontraron que la variación de la expresión génica entre individuos no emparentados era lo suficientemente acusada como para enmascarar el efecto de la desregulación, explicando por qué este efecto no fue identificado antes, explicaron que la variación genética entre individuos podía enmascarar los efectos de la trisomía sobre la expresión génica de otras regiones del genoma.

Los investigadores señalaron que la mera adición de un pequeño trozo de ADN, puede perturbar el transcriptoma entero, no sólo alterándolos, sino alterándolos de forma específica y programada. Además, señalaron que tal disturbio de regulación génica podría ser común en otras anomalías cromosómicas y, posiblemente, el cáncer.

Los autores, investigaron los cambios en la metilación del ADN como una posible causa del GEDDs, pero no encontraron cambios significativos en los patrones de metilación del ADN entre las células de cada gemelo. Los investigadores correlacionan estos dominios disfuncionales con dominios asociados a la membrana nuclear interna previamente identificados (Letourneau et al., 2014).

1.3.2.2. Trisomía 18 (Síndrome de Edwards).

La trisomía 18 fue descrita por Edwards y colaboradores en 1960 (Edwards et al., 1960), se trata de una anomalía cromosómica que se asocia a la presencia de un cromosoma extra 18, ya sea como tres cromosomas completos 18 (94% de los casos), trisomía parcial 18q o trisomía 18 en mosaico (5% casos). Es la segunda aneuploidía autosómica más frecuente con una prevalencia de 1 en 8000 nacidos vivos (Cereda y Carey, 2012; Chuchracki et al., 2012).

Ocurre como consecuencia de la no disyunción meiótica durante la ovogénesis, siendo más común la no disyunción durante la meiosis II (MII). Su prevalencia aumenta con la edad materna (Cereda y Carey, 2012).

El patrón clínico de la trisomía 18 se caracteriza por retraso grave del crecimiento asociado a múltiples malformaciones: orejas bajas, cuello corto, pies deformes. Presentan problemas cardiacos congénitos (80-100% de los casos, siendo las más frecuentes canal atrioventricular, displasia polivalvular y atresia mitral), insuficiencia respiratoria (hipoventilación, aspiración, u obstrucción de vía aérea superior), hipertonía, onfalocele, anomalías renales, hernia diafragmática, espina bífida. Malformaciones de las extremidades se da en un 5-10% de los casos (dedos en garra muy importante para el diagnóstico mediante ecografía, pies equino-varo). Infecciones en el tracto urinario. Anormalidades estructurales del sistema nervioso central (apnea que es la principal causa de muerte prematura, hipoplasia cerebral, agenesia del cuerpo calloso, microgiria, hidrocefalia y mielomeningocele). Discapacidad psicomotriz e intelectual con retraso en el desarrollo cognitivo. Mayor riesgo a sufrir alguna neoplasia. En un 95% de los casos ocurre un aborto espontaneo (Witters et al., 2011).

Su supervivencia postnatal es escasa, ya que está asociada a una alta letalidad intrauterina. Aproximadamente el 50% de los bebés con trisomía 18 viven más de 1 semana y el 5-10% de los niños sobreviven más allá del primer año. Resumiendo, entre 1 de cada 10 a 1 de cada 20 bebés vive en su primer cumpleaños, el término utilizado como "anormalidad letal" es inexacta, engañosa e inadecuada.

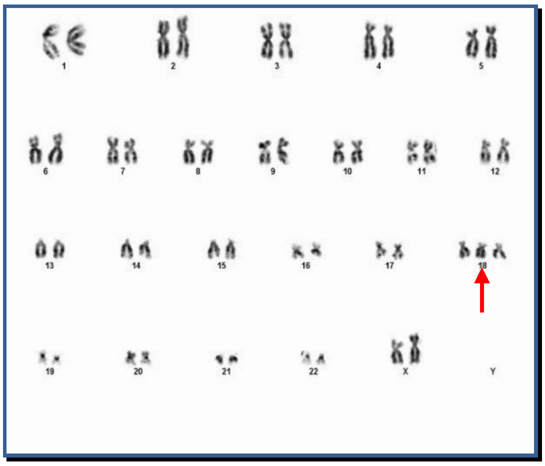


Figura 21. A) Niño con trisomía 18 completa en edad temprana **B)** Con un año de edad. En la actualidad tiene más de 2 años de edad (Cereda y Carey, 2012).

Figura 22. Cariotipo que presenta una trisomía 18 completa.

1.3.2.3. Trisomía 13 (Síndrome de Patau).

El síndrome de Patau es una aneuploidía autosómica descrita por K. Patau y colaboradores en 1960 (Patau et al., 1960). Tiene una prevalencia de 1 en 10000 a 1 en 20000 nacidos vivos.

Se debe a la presencia de un cromosoma extra 13 (Figura 23) como consecuencia de la no disyunción en la meiosis en un 80% de los casos y en un 20% de los casos ocurre por translocación desequilibrada. La trisomía 13 en mosaico es muy poco frecuente ocurre solo en el 5% de los casos. Al igual que la mayoría de las trisomías su prevalencia aumenta con la edad materna. Tiene una alta letalidad intrauterina. La esperanza de vida media de síndrome de Patau es de 7-10 días y el 90% mueren en el primer año de vida. La supervivencia suele atribuirse fundamentalmente a mosaicismo (Plaiasu et al., 2010; Peroos et al., 2012).

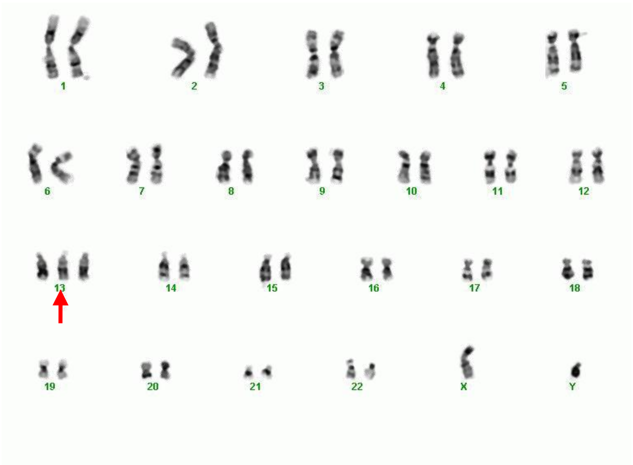


Figura 23. Cariotipo que presenta una trisomía 13 completa.

Se caracteriza por presentar múltiples malformaciones fetales. Restricción del crecimiento intrauterino, cabeza pequeña, cráneo con microcefalia con frente inclinada, ojos pequeños, labio leporino y paladar hendido, polidactilia en manos y pies, malformaciones del sistema nervioso central (holoprosencefalia), retraso mental grave, defectos cardiacos graves, anomalías renales, anomalías faciales, higroma quístico, onfalocele (Nussbaum et al., 2008).

1.3.2.4. Monosomía X (Síndrome de Turner).

El síndrome de Turner es una aneuploidía de los cromosomas sexuales, descrita por Henry Turner en 1838 (Turner, 1938). Tiene una prevalencia de 1 de cada 2500 hembras nacidas vivas y se asocia con la pérdida total o parcial del segundo cromosoma sexual.

Resulta de la no disyunción en la meiosis. En esta aneuploidía la pérdida del cromosoma X (Figura 24) se atribuye al padre en el 75% de los casos. Otras causas son: isocromosoma del brazo largo del cromosoma X en un 17% y en un 10% hay una delección del brazo corto del cromosoma X. No se asocia con la edad materna avanzada. Es muy característica la presencia de mosaicos (30-40%).

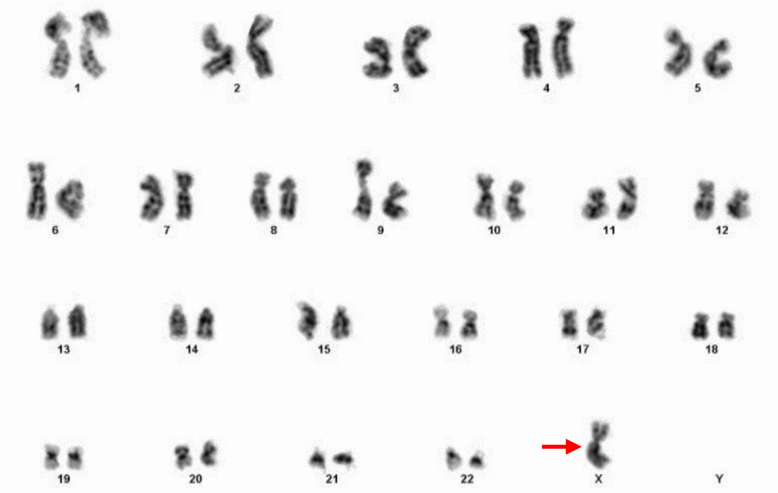


Figura 24. Cariotipo que presenta 45 cromosomas de sexo femenino, observándose un cromosoma X.

Es una de las anomalías más comunes, sin embargo, presenta una elevada pérdida fetal, sólo el 1% de fetos sobreviven a largo plazo. Por lo tanto, es responsable del 7-10% de todos los abortos espontáneos.

Presenta una amplia variedad de manifestaciones clínicas. La enfermedad cardiovascular es la causa más común de muerte en adultos, otras características son:

insuficiencia gonadal, hipotiroidismo, alteraciones renales, hipercolesterolemia, hipertensión, problemas gastrointestinales, enfermedad hepática, osteoporosis y enfermedad gastrointestinal. Presenta unos rasgos dismórficos característicos como reducción en la altura, cuello corto, micrognatia, línea de implantación baja posterior, cuarto metacarpiano corto, cuello plegado, linfedema de manos y pies, escoliosis, tórax ancho con pezones muy separados (Elsheikh et al., 2002; Bondy et al., 2007; Davenport, 2010).

1.3.2.5. Trisomía XXY (Síndrome de Klinefelter).

El síndrome Klinefelter es una aneuploidía de los cromosomas sexuales, descrito por Harry Klinefelter en 1942 (Klinefelter, 1942), tiene una prevalencia de uno de cada 500 nacidos vivos varones.

Se caracteriza por la presencia adicional de uno o más cromosomas X. El cariotipo más común es 47, XXY (Figura 25) aunque existen otras variantes menos frecuentes. Resulta de la no disyunción materna en meisosis I y II (no disyunción paterna en meisosis I ocurre en un 50% de los casos) o a errores postcigóticos que conducen a mosaicos e un 20% de los casos. La probabilidad de no disyunción del cromosoma X aumenta con la edad materna. Este síndrome presenta distintas variantes con fenotipos muy variables: 47,XYY; 48,XXYY;48,XXXY;49,XXXXY.

Figura 25. Cariotipo en el que se observan dos copias para el cromosoma X y una copia para el cromosoma Y.

Los varones con 47, XXY tienen características fenotípicas muy variables: no tienen dismorfología facial evidente, por lo que no se distinguen de los otros chicos con cariotipos normales Es la causa más frecuente de fracaso testicular con testículos pequeños, ginecomastia, hipogonadismo, este síndrome se asocia a pacientes infértiles ya que las células germinales no se desarrollan con normalidad, presentan oligospermia

o azoospermia. Suelen presentar cáncer de mama en edad adulta. Presentan dificultades sociales, de comportamiento y aprendizaje en la edad adulta, retraso en el lenguaje. Tienen una estatura alta (brazos más largos que las piernas), vello corporal escaso y las proporciones corporales eunucoides, a menudo no son identificados hasta después de la pubertad (Visootsak y Graham, 2006; Aksglaede et al., 2013; Groth et al., 2013).

1.4. MECANISMO DE LA NO DISYUNCIÓN MEIÓTICA COMO CAUSANTE DE LAS ANEUPLOIDÍAS.

El efecto de la edad materna avanzada sobre la incidencia de las aneuploidías ha sido estudiado por muchos autores. Basándose en grandes muestras de ovocitos han proporcionado evidencias de una correlación directa entre el aumento de la frecuencia de tener una aneuploidía y la edad materna avanzada, aclarando la contribución de una segregación deficiente en las aneuploidías dependientes de la edad materna (Penrose, 1993; Angell, 1997; Rosenbusch, 2004; Pellestor et al., 2005; Jones, 2008; Allen et al., 2009; Ghosh et al., 2009). En el caso particular de la trisomía 21 que es la condición aneuploide más estudiada, el par cromosómico 21 no se separa adecuadamente en una de las dos divisiones de la meiosis (en general durante la meiosis I), cuando esto ocurre y van juntos a una de las células hijas ocurre lo que conocemos como la **"no disyunción"** cromosómica (Figura 26). El ovocito resultante tendrá 24 cromosomas en lugar de 23. Entre un 10% y un 35% de aneuploidías en los seres humanos son causadas por el mecanismo de la no disyunción (Hassold et al., 1996; Angell, 1997; Hassold et al., 2007; Novo Villaverde, 2007; Nussbaum et al., 2008).

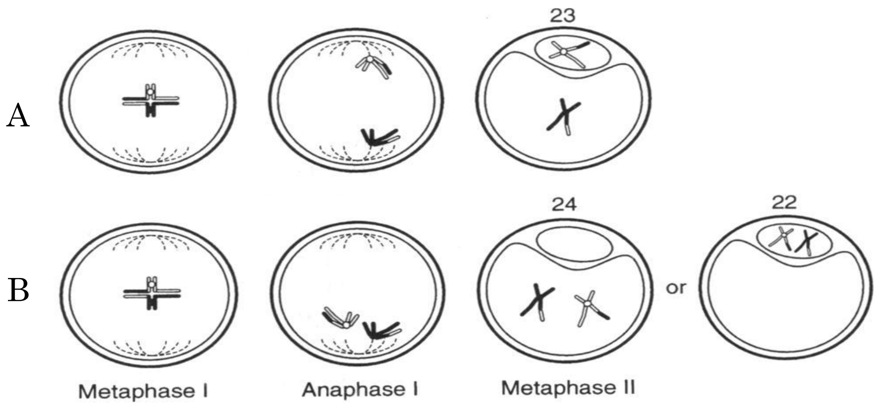


Figura 26. A) Disyunción cromosómica normal de la división de meiosis I. B) No-disyunción de la meiosis I (Angell, 1997).

La no disyunción está asociada a un fallo en el emparejamiento de los cromosomas homólogos y/o en los procesos de recombinación (crossing over), en el 45% de los casos de la no disyunción materna no había procesos de recombinación. Todos estos hechos contribuyen a que aumente el riesgo de que falle la segregación de la pareja de cromosomas homólogos durante la anafase I de la meiosis I (MI) y ambos homólogos vayan al mismo polo, mientras el polo opuesto quede vacío (la no disyunción produce gametos o células que contienen un cromosoma adicional y otros a los que les falta un cromosoma) (Pierce, 2009) (Figura 27). Cuando dos cromátidas hermanas no se separan en anafase de la meiosis II, se produce la no disyunción en la meiosis II (MII) (Figura 27). La mayoría de los errores ocurren durante la fase de meiosis I.

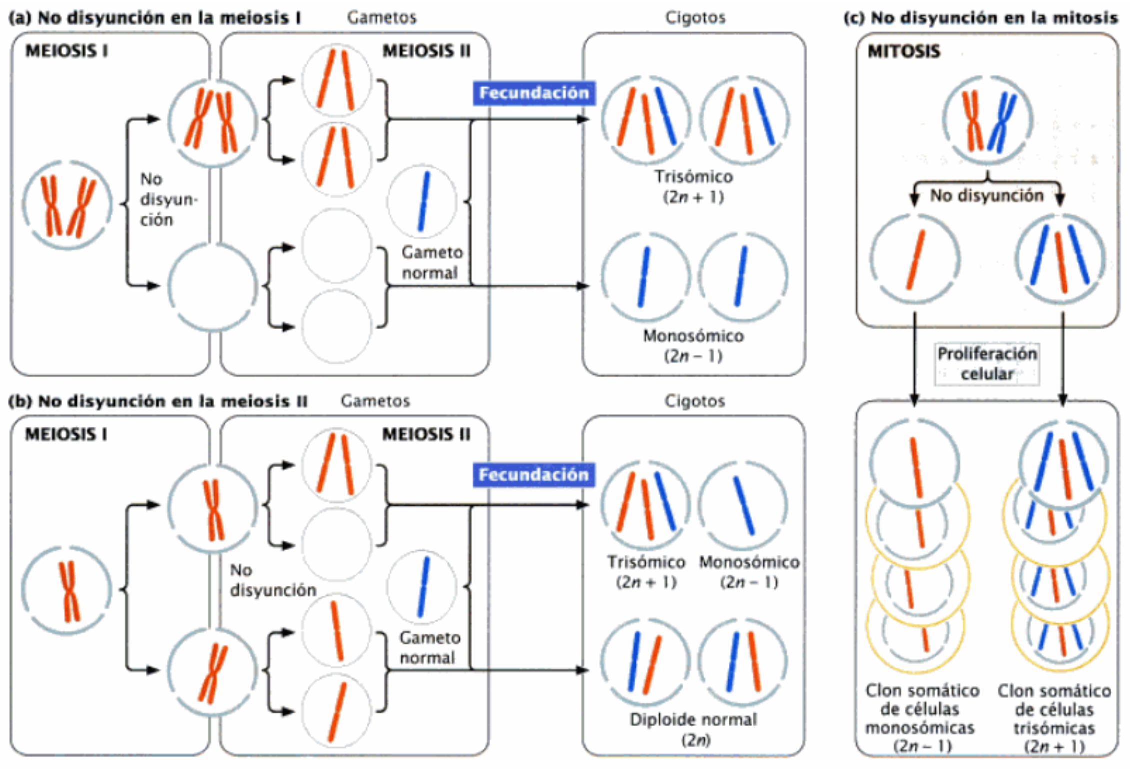


Figura 27. A) No disyunción en la meiosis I **B)** No disyunción en la meiosis II (Pierce, 2009)

Se ha comprobado que también influye el sitio de intercambio en la no disyunción. Si ocurre cerca del telómero 21q el riesgo de que aparezca la no disyunción es mayor. En mujeres jóvenes se ha comprobado que un intercambio cerca del telómero 21q es un factor de riesgo frecuente de no disyunción en MI en el 80% de los casos explicando que haya no disyunción en mujeres por debajo de los 35 años, problema que

se debe a fallos en los procesos de recombinación. El riesgo de no disyunción en meiosis II aumenta si el intercambio ocurre cerca del centrómero, es decir, algo que ocurre en la MI puede influir en la no disyunción en la MII, se puede decir por lo tanto que algunos errores en la fase MII se inician en la MI (Oliver et al., 2008; Freeman et al., 2009; Ghosh et al., 2009).

Las consecuencias de la no disyunción en la meiosis I son diferentes a un error en la meiosis II. Un error en la MI ocasiona que el gameto contenga ambos homólogos de una pareja de cromosomas. En cambio, la no disyunción en la MII hace que el gameto reciba dos copias de uno de los dos homólogos de la pareja de cromosomas así: en la meiosis I, se producirán 2 gametos nulisómicos (sin ninguna copia de ese cromosoma) y dos gametos disómicos (los gametos contienen un representante de ambos cromosomas del par 21), los cuales llevarán una copia de cada cromosoma homólogo presente en la célula progenitora (es decir, son heterodisómicos). Por el contrario, si la no disyunción sucede en la meiosis II, tendremos 2 gametos normales, un gameto nulisómico y un gameto disómico con dos copias idénticas (dos copias de uno de los cromosomas 21) (isodisómico) (Figura 27A-B) (Novo Villaverde, 2007; Nussbaum et al., 2008).

La no disyunción en las aneuploidías deriva de errores, ausencia o alteración en la recombinación que ocurre mayoritariamente durante la meiosis de los ovocitos maternos en un 90% de los casos y en un 10% de los casos en los espermatozoides paternos (Freeman et al., 2007; Jones, 2008; Hassold y Hunt, 2009; Hulten et al., 2010). Diversos estudios han demostrado que el aumento de la edad de la madre está asociada de manera específica con los errores que aparecen durante la producción de ovocitos (ovogénesis) (Freeman et al., 2007; Turleau et al., 2010). La materna es la causa predominante de las aneuploidías autosómicas 21, 18 y 13 y de trisomías como 47,XXX. La no disyunción paterna es la predominante en el origen de la monosomía 45,XO y de la condición 47,XYY y constituye cerca del 50% del origen de la aneuplodía XXY. Esta diferencia de la no disyunción entre los sexos está relacionada con la presencia del par XY en el varón, con una región pseudoautosómica corta que restringe la posibilidad de quiasmas y predispone la no disyunción de los cromosomas sexuales, sin tener relación alguna con la edad.

1.4.1. Causas de la no disyunción.

A pesar de la importancia clínica de las aneuploidías apenas se conocen las causas y los factores de riesgos asociados a lo no disyunción. La edad materna avanzada es el único factor de riesgo claramente estudiado para que ocurra el fenómeno de la no disyunción meiótica, sin embargo, se desconocen los mecanismos básicos que la causan (Nicolaidis et al., 1998).

Existen varias hipótesis que intentan explicar la relación entre la edad materna y la no disyunción, una de ellas en la cual puede estar implicada en el mecanismo de la no disyunción con la edad materna es el largo tiempo durante el cual transcurre la meiosis en la mujer. La meiosis se inicia en el feto femenino a las 11-12 semanas de su gestación cuando se da el emparejamiento de cromosomas, sinapsis y procesos de recombinación y se interrumpe durante años en profase I (diploteno) hasta después de la ovulación en la mujer madura, este proceso de quinescencia se llama dictiotena, el ovocito primario puede permanecer así más de cincuenta años. Los componentes del huso y otras estructuras requeridas para la segregación cromosómica pueden alterarse en el periodo de detención prolongada de la meiosis (Mueller y Young, 2001; Steuerwald et al., 2007; Pierce, 2009). El ovocito completa la fase MI y progresa hacia la metafase II, permanece en esta fase hasta que es fertilizado finalizándose su proceso meiótico. En el caso de la producción de espermatozoides en el varón es diferente, entran en meiosis y pasan de un estado a otro sin que haya ninguna parada. Se piensa que en el caso de la mujer este periodo de tiempo tan prolongado en el que la formación de ovocitos permanece parada está relacionado con la no disyunción materna en relación a la paterna. Conforme avanza la edad de la mujer se van acumulando distintos factores que dan lugar a un agotamiento progresivo de los ovocitos facilitando el mecanismo de la no disyunción (Figura 28) (Warburton, 2005; Steuerwald et al., 2007; Hulten et al., 2008; Oliver et al., 2008; Pierce, 2009; Hassold y Hunt, 2009).

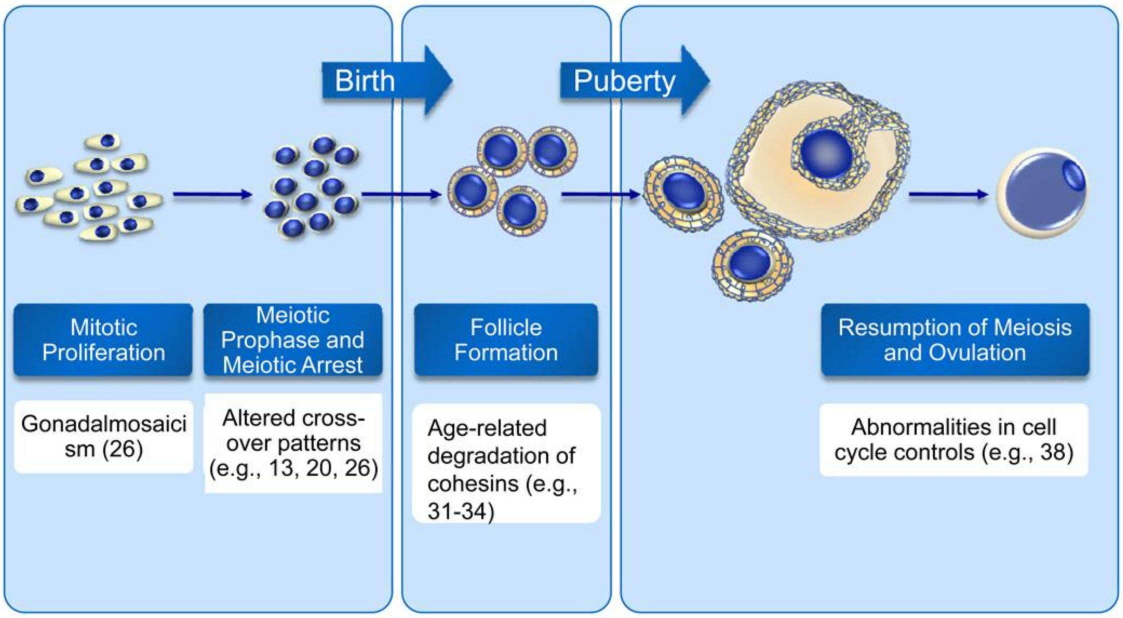


Figura 28. Ciclo de vida del ovocito humano. Hay varios puntos de tiempo diferentes en los que pueden ocurrir eventos que aumentan la probabilidad de no disyunción meiótica en las mujeres de mayor edad **(**Hassold y Hunt, 2009).

La ausencia de recombinación en la profase de la MI predispone a la no disyunción posterior. Este hecho no es sorprendente ya que los quiasmas que se forman en la profase de la MI después de la recombinación son responsables de mantener cada pareja de cromosomas homólogos juntos hasta que se produzca la separación posterior en la diacinesis. De esta forma, el fallo en la formación de los quiasmas podría permitir que cada pareja de homólogos se separase prematuramente y se segregase después de forma aleatoria en las células hijas. Los quiasmas que están demasiado cerca de los centrómeros o de los telómeros favorecen los errores en la separación de los cromosomas homológos. Actualmente se piensa que la maquinaria que procesa los quiasmas va perdiendo eficacia con los años, por lo que los oocitos con quiasmas en localizaciones "subóptimas" originan errores de disyunción con mayor facilidad en oocitos "viejos" que en oocitos "jóvenes". Esto encaja bien con el hecho de que las aneuploidías son más frecuentes al aumentar la edad materna (Novo Villaverde, 2007).

En un estudio realizado por Lamb y colaboradores (Lamb et al., 2005), en el que observaron los patrones de recombinación de 400 casos -agrupados por edad materna- que presentaban trisomía 21 por no disyunción, observaron que actuaban múltiples factores, unos dependían de la edad materna y otros no. Al comparar el 34% de las madres jóvenes con el 10% de las madres de edad avanzada observaron como la meiosis

funcionaba correctamente excepto cuando lo intercambios ocurrían cercanos al centrómero y telómero. Concluyeron que la meiosis en mujeres de edad avanzada va acumulando efectos ambientales relacionados con la edad dando lugar a mayores tasas de errores relacionados con los patrones de recombinación.

Existe otro estudio en el que se analizó la expresión de 8500 genes en ovocitos de distintas edades. La edad del ovocito cambiaba la magnitud de expresión de los genes relacionados con la regulación del ciclo celular, estructura del citoesqueleto de la célula, función mitrocondrial, daño oxidativo, tráfico de proteínas, respuesta al estrés celular y la regulación de la transcripción. Se puede así observar que conforme aumenta la edad de la mujer su capacidad de fecundar disminuye y el riesgo de que aparezcan alteraciones en la meiosis aumenta dando lugar a alteraciones en los cromosomas (Oliver et al., 2008).

Estos hallazgos sugieren que existen otras causas además de la edad materna avanzada para que ocurra el mecanismo de la no disyución como son las propias de la meiosis aunque son poco conocidos (Pacchierotti et al., 2007).

1.5. MOSAICISMO CROMOSÓMICO.

Se habla de mosaicismo cromosómico cuando en un individuo coexisten dos o más líneas celulares diferentes en su composición genética. La mayoría de los mosaicismos son aneuploidías y puede afectar a cualquier tipo celular incluyendo los gametos. La causa es la no disyunción en una división mitótica poscigótica temprana. El mosaicismo se detecta mediante un estudio de los cromosomas a través del cariotipo convencional y se describe como un porcentaje de las células examinadas. Representa un problema serio en el consejo de diagnóstico prenatal ya que es impredecible el grado de afectación que tendrá el individuo debido a su variabilidad fenotípica. Existe una amplia gama de manifestaciones clínicas, algunos fetos exhiben las anormalidades fenotípicas típicas mientras que otros parecen normales (Nussbaum et al., 2008).

Se puede dar el caso de un feto con un cariotipo normal (línea celular normal) y que la placenta presente mosaicismo para una trisomía que no aparece en el feto

hablamos de mosaicismo confinado a la placenta. A pesar de que el feto sea cromosómicamente normal (diploide) esta situación puede ocasionar que fenotípicamente no lo sea, esto se debe a un fenómeno conocido como rescate trisómico y consiste en que una concepción trisómica no viable es rescatada por pérdida de una de las copias del cromosoma extra implicado en la trisomía en la fase poscigótica originando la diploidía fetal. Cuando el cigoto es trisómico, el linaje celular placentario normal establecido por la pérdida postcigotica del cromosoma adicional en una célula progenitora del citotrofoblasto puede incrementar la probabilidad de supervivencia intrauterina en un feto trisómico. La función placentaria es el mayor determinante de la supervivencia intrauterina. Si por azar, el cromosoma rescatado es la única copia que aporta uno de los progenitores se produce una disomía uniparental en las células restantes (Nussbaum et al., 2008).

Robberecht y colaboradores (2012), demostraron que en 2 de los 9 casos de su estudio de mosaicismo confinado a la placenta ocurría como consecuencia de rescate trisómico en la fase poscigótica (Robberecht et al., 2012).

Se han estudiado casos de mosaicismo confinado a la placenta en los que el feto tuvo un desarrollo normal (Baffero et al., 2012), sin embargo, existen evidencias de mosaicismo confinado a la placenta con un mal pronóstico de muerte fetal. Alrededor del 80% de los embarazos progresa normalmente, pero existe otro porcentaje con problemas durante el embarazo como restricción del crecimiento intrauterino, prematuridad, malformaciones fetales y muerte fetal (Labeau-Gaüzere et al., 2011). Este caso pone de manifiesto los posibles efectos adversos del mosaicismo confinado a la placenta y de la importancia del examen de la placenta en la determinación de la causa de la muerte del feto (Goodfellow et al., 2011).

La confirmación citogenética de un mosaicismo resulta a veces compleja, si el mosaicismo afecta a varias células en un único cultivo primario se considera que refleja un mosaicismo que se ha originado en el propio cultivo. Existen casos de pseudomosaicismo en el que se observa una dotación cromosómica distinta a la del resto en una sola célula. El mosaicismo verdadero se detecta en colonias múltiples de varios cultivos primarios distintos (Nussbaum et al., 2008). La contaminación por

células maternas es una posible explicación de algunos casos de mosaicismo aparente en el que están presentes líneas celulares XX y XY.

El mosaicismo cromosómico se identifica con mayor frecuencia en los trastornos de los cromosomas sexuales. Los mosaicos más frecuentes en los cromosomas sexuales son 45,X/46,XX, 46,XX/47,XXX o 46,XY/47,XXY.

Un caso de mosaicismo en los cromosomas sexuales es 45,X/46,XY se asocia con una amplia variedad de fenotipos que van desde el desarrollo masculino aparentemente normal hasta individuos con una diferenciación incompleta sexual y signos clínicos de síndrome de Turner tanto en hombres como en mujeres (Efthymiadou et al., 2012).

Aproximadamente el 2-3% de todos los nacidos vivos con trisomía 21 son mosaicos, individuos con dos líneas celulares, una línea celular normal con 46 cromosomas y una línea celular anormal con 47 cromosomas (Dutta et al., 2012). El mosaicismo de anomalías cromosómicas estructurales se da con muy baja frecuencia.

En pacientes con mosaico de trisomía 21 existe una correlación significativa positiva entre el porcentaje de células anormales y la severidad del fenotipo y una correlación inversa entre la supervivencia global y el porcentaje de células anormales (Chen et al., 2012). Los pacientes con bajo porcentaje de células trisómicas de trisomía 21 tienen menos manifestaciones fenotípicas, un coeficiente intelectual más alto y una mejor supervivencia general (Leon et al., 2010). En un estudio se revisaron 305 casos que incluían embarazos con mosaicos de las trisomías de los cromosomas autosómicos 21, 18 y 13. Los embarazos que llegaron a término y los fetos que resultaron vivos tuvieron una media de células anormales trisómicas menor del 10%. Cuando la media de células trisómicas es mayor del 31% para estas tres trisomías en mosaico no se reportaron fetos nacidos vivos normales (Wallerstein et al., 2000).

En individuos con mosaico de trisomía 13 no existe una clara correlación entre el porcentaje de células trisómicas y el nivel de funcionamiento intelectual. El fenotipo varía considerablemente de un paciente a otro. En general, el mosaico de trisomía 13 presenta anomalías físicas y bajo nivel intelectual pero existen individuos con un desarrollo normal (Cereda y Carey, 2012).

El mosaico de trisomía 18 ocurre en menos del 5% de los casos, presenta un fenotipo muy variable desde individuos que mueren tempranamente como en el caso de una trisomía 18 completa hasta individuos que aparentemente presentan fenotipos normales. Al igual que ocurre con el mosaico de trisomía 13, no hay correlación entre el porcentaje de células con trisomía 18 y en la gravedad de las manifestaciones clínicas y discapacidad intelectual (Tucker et al., 2007; Cereda y Carey, 2012).

1.6. DIAGNÓSTICO PRENATAL INVASIVO.

La amniocentesis y la biopsia de las vellosidades coriales (VC) son técnicas invasivas que se practican rutinariamente en embarazos con riesgo de padecer algún tipo de anomalía cromosómica en el feto. Se llevan a cabo para el análisis de los cromosomas mediante el cariotipo fetal o la técnica QF-PCR. Estos procedimientos invasivos proporcionan un diagnóstico de certeza, sin embargo, tienen el problema que conllevan también ciertos riesgos, entre ellos el riesgo de pérdida fetal. Esto justifica la necesidad de ajustar al máximo las indicaciones para la realización de dichas pruebas, evitando la realización de un número importante de amniocentesis y biopsias coriales ya que el riesgo de pérdida fetal es del 1% en ambas técnicas (Kollmann et al., 2013).

La práctica de estas técnicas se utiliza a menudo con mujeres de una edad materna avanzada (≥35 años) o en casos de riesgo elevado de padecer alguna anomalía cromosómica (≥1/270). Sin embargo, no en todos los casos se realiza bajo las indicaciones mencionadas anteriormente.

1.6.1. Amniocentesis.

La amniocentesis es una prueba invasiva que consiste en obtener líquido amniótico (LA) mediante una punción uterina transabdominal. La amniocentesis permite obtener líquido amniótico y células fetales para la detección de anomalías cromosómicas y defectos del tubo neural (Tseng et al., 2006; Chang et al., 2012). Se efectúa entre las 14 y las 20 semanas de gestación. La finalidad de la amniocentesis es el estudio de los cromosomas para determinar si existe alguna anomalía cromosómica.

La técnica de la amniocentesis para el diagnóstico genético comenzó a finales de los años 60 y principios de los 70 donde se consiguió cultivar las células del líquido amniótico (Jacobson et al., 1967; Wang et al., 2009). La práctica de esta técnica se realizaba a ciegas a principios de los años 70 y no fue hasta finales de esta década y comienzos de los 80 cuando gracias a la ayuda de los ultrasonidos se pudo identificar una zona libre de placenta para poder llegar fácilmente al líquido amniótico.

La amniocentesis realizada en el segundo trimestre de gestación es más segura que la biopsia corial transcervical y la amniocentesis temprana. Si se requiere de un diagnóstico temprano es más conveniente la realización de una biopsia corial transabdominal a la realización de una amniocentesis temprana. En circunstancias en las que la biopsia corial transabdominal pueda ser técnicamente difícil la mejor opción es la biopsia corial transcervical en el primer trimestre o la amniocentesis en el segundo trimestre (Alfirevic et al., 2003). Una desventaja importante de la amniocentesis en el segundo trimestre es que habitualmente el resultado del cariotipo está disponible sólo después de las 18 semanas de gestación. Esta es la principal limitación que tiene la técnica, ya que en el caso en el que el resultado sea patológico la decisión de llevar a cabo un aborto se retrasaría.

La técnica de amniocentesis guidada ecográficamente puede realizarse mediante la técnica transabdominal o trasvaginal/trascervical. En la actualidad, la elección de la técnica y de los instrumentos se basa en la preferencia personal del operador especializado. Se ha estudiado que el tipo de instrumento utilizado podría tener un impacto significativo en la tasa de éxito del procedimiento (Young et al., 2013).

1.6.2. Biopsia de las vellosidades coriales.

La amniocentesis efectuada a las 16 a 18 semanas ha sido el método de elección para el diagnóstico citogenético prenatal. Sin embargo, en los últimos años, estudios sobre las vellosidades coriónicas han confirmado la seguridad y eficacia de la toma de muestras de vellosidades coriónicas como una alternativa viable para las mujeres que buscan un diagnóstico prenatal anticipado. En la actualidad es la técnica de elección en el cribado de aneuploidías del primer trimestre (Blumenfeld y Chueh, 2010).

La biopsia de corión consiste en obtener tejido trofoblástico, y se realizó en los años 80 como una alternativa a la amniocentesis. Se puede realizar la técnica por via transcervical o transabdominal (Carlin et al., 2008; Young et al., 2013) basándose en la localización placentaria y en la posición uterina. Se realiza entre las 11 y las 12 semanas de gestación y nunca antes de la semana 11, debe realizarse por personal entrenado (Gnyś-Wiercioch et al., 2012).

Varios estudios aleatorizados han demostrado que las tasas de aborto tras una biopsia corial son las mismas que las de la amniocentesis del segundo trimestre, aproximadamente un 1% (Tabor et al., 2009; Yair et al., 2010).

En la actualidad la biopsia corial es una alternativa a la amniocentesis y debe ser considerada como el método de elección cuando existe un alto riesgo de un feto afectado por una trisomía y se requiera una interrupción voluntaria del embarazo (Antsaklis et al., 2002).

La indicación principal de esta técnica es conocer el cariotipo fetal y al igual que la amniocentesis tiene la posibilidad de estudiar una amplia gama de alteraciones en el ADN fetal. La ventaja que proporciona la biopsia corial respecto a la amniocentesis es que el resultado se obtiene en el primer trimestre de gestación, esto reduce la ansiedad de las gestantes y ofrece la posibilidad de una terminación precoz del embarazo en caso de que el resultado de la prueba sea negativo.

La diferencia principal entre amniocentesis y biopsia corial en cuanto a los resultados es la incidencia de mosaicos. La desventaja que presenta la biopsia corial es la presencia de mosaicismo confinado a la placenta en el 1-2% de los casos y la posibilidad de contaminación de células maternas. En estas circunstancias habría que realizar una amniocentesis para determinar si el feto sufre alguna alteración cromosómica y para confirmar el diagnóstico (Subdberg et al., 1997; Gnyś-Wiercioch et al., 2012). La contaminación materna es poco frecuente pero se puede dar el caso ya que las muestras obtenidas en la biopsia corial son una mezcla de vellosidades coriales y decidua materna.

1.7. PCR CUANTITATIVA FLUORESCENTE.

A principios del año 1990 la técnica PCR cuantitativa fluorescente (Quantitative Fluorescent o QF-PCR) comenzó a realizarse como método molecular para la detección de las principales aneuploidías cromosómicas (Mansfield, 1993; Pertl et al, 1994; Adinolfi et al, 2000). Es una técnica de citogenética molecular utilizada en el diagnóstico prenatal rápido de aneuploidías para la detección de los cromosomas 21, 18, 13 (Ogilvie et al., 2005), X e Y (Donaghue et al., 2003). Consiste en la amplificación y cuantificación de regiones específicas de ADN mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), para ello utiliza primers (cebadores) marcados con fluorocromos (Cirigliano et al., 2004; Mann et al., 2004).

Los STRs (short tandem repeats) o microsatélites son unas regiones de ADN de número variable no codificante repetidas en tándem localizadas por todo el genoma y cuya longitud varia de 2 a 6 pb (Mansfield, 1993). Los STRs son muy polimórficos debido a la variación en el número de unidades de repetición (variación en el tamaño de los alelos). Los individuos se diferencian por el número de repeticiones de esa secuencia. Un individuo heterocigoto posee dos alelos con un número distinto de repeticiones. La detección de zonas conocidas mediante la técnica PCR identifica de forma indirecta el número de copias que tiene un cromosoma de interés debido a las diferencias que existe entre los alelos.

Los STRs dan información del número de copias de cada cromosoma. Un individuo normal heterocigoto presenta secuencias polimórficas diferentes en cada alelo, por ello, se observa en el analizador genético dos picos con una razón 1:1 por cada región cromosómica analizada, siendo este marcador informativo para el análisis realizado. En el caso de que el individuo presente una trisomía se observan tres picos debido a la presencia de más de dos alelos o doble altura en uno de ellos con una razón de picos 2:1 ó 1:2. Estas razones de picos se calculan con el área y con la altura de los picos (Figura 29).

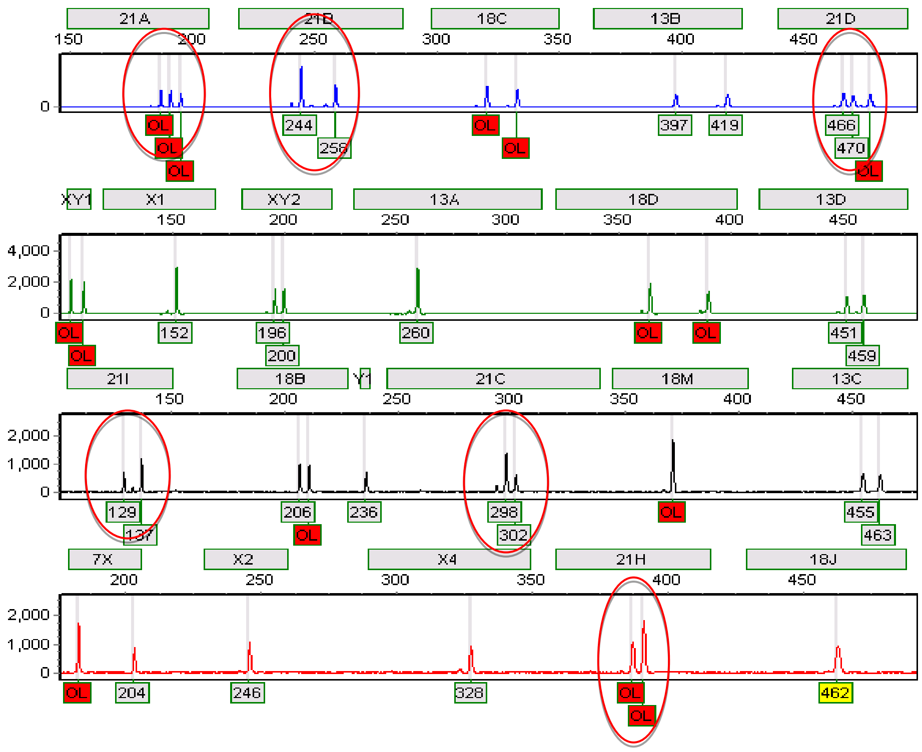


Figura 29. En el electroferograma se muestra la detección de una trisomía 21. En los seis marcadores analizados del cromosoma 21 aparece un patrón trialélico (3 alelos o 2 alelos desequilibrados en tamaño con un ratio de 2:1). Este resultado es indicativo de la existencia de una trisomía 21. Los círculos en rojos identifican los marcadores informativos.

La QF-PCR es muy importante en el campo del diagnóstico prenatal ya que permite un diagnóstico rápido en 24-48 horas sin necesidad de cultivar las células fetales. Se considera una alternativa válida al cariotipo convencional debido a su bajo coste, reducido volumen de muestra, detección de contaminación materna y a que es una técnica casi enteramente automatizada. Presenta un valor predictivo de un 100% en manos de personal cualificado y se trata de un método sensible, específico y preciso.

La QF-PCR como prueba independiente tiene una tasa de detección de aneuploidías de los cromosomas 21, 18, 13, X e Y de un 98.5% a un 99.9% (Cirigliano et al., 2004; Brown et al., 2006; Hills et al., 2010; Allingham-Hawkins et al., 2011; Speevak et al., 2011). Un inconveniente de la QF-PCR es su incapacidad para detectar mosaicismo cuando la aneuploidía está presente en menos del 15-20% de las células (Donaghue et al., 2005; Cirigliano et al., 2006).

El cariotipo ha sido considerado el ―gold estándar" en el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas. El análisis del cariotipo implica el estudio del número y la estructura de los 23 pares de cromosomas obtenidos mediante amniocentesis o biopsia de vellosidades coriónicas (Wilson et al., 2005). El periodo de cultivo de los cromosomas es largo y tedioso, no estando disponibles los resultados hasta 10-14 días.

Ogilvie (2003) y Leung (2004), propusieron reemplazar el análisis del cariotipo convencional por la técnica QF-PCR al observar que las ventajas de esta técnica eran claramente superiores a las desventajas. Es una técnica muy precisa en el diagnóstico del síndrome de Down y otras anomalías cromosómicas (Ogilvie, 2003; Leung et al., 2004).

Una de las objeciones de la QF-PCR como una prueba independiente es el número de anormalidades cromosómicas que se perderían, al no realizarse el cariotipo como prueba complementaría. Leung y colaboradores (2004), concluyeron que la mayoría de anomalías no detectadas por la QF-PCR (anomalías cromosómicas estructurales, mosaicismos y anomalías cromosómicas numéricas diferentes a los cromosomas 21, 18, 13 y cromosomas sexuales) son clínicamente irrelevantes, requieren un asesoramiento genético intensivo y sus resultados son imprevisibles (Ogilvie, 2003; Leung et al., 2004).

La QF-PCR como prueba independiente para el diagnóstico prenatal en casos de embarazos sin alteraciones ecográficas reduce los costes y ofrece una entrega rápida de los resultados. Con ello se evitaría resultados ambiguos e inciertos del cariotipo disminuyendo, en la medida de lo posible, la ansiedad de los padres. El cariotipo quedaría relegado solo para determinadas indicaciones (alteraciones ecográficas) (Hills et al., 2010; Gekas et al., 2011; Papoulidis et al., 2012).

La QF-PCR tiene un alto nivel de concordancia con el cariotipo convencional. Algunos estudios han revelado hasta la fecha un 99.6% de concordancia entre ambas pruebas (Mann et al., 2001; Ogilvie et al., 2005a; Cirigliano et al., 2009). La QF-PCR es capaz de detectar más del 80% de anomalías clínicamente significativas (Shaffer et al., 2007; Leung et al. 2008; Hill et al., 2010; Allingham-Hawkins et al., 2011), sin embargo, un 0.1% de anomalías clínicamente significativas no sería detectado por la

QF-PCR teniendo graves consecuencias fenotípicas, esto cuestiona el uso de la técnica como método único de elección para el diagnóstico de anomalías cromosómicas (Caine et al., 2005; Ogilvie et al., 2005b; Comas et al., 2010; Papoulidis et al., 2012).

Es importante tener en cuenta lo que distintos estudios han publicado con respecto a las anomalías cromosómicas encontradas por el cariotipo que no serían detectadas por la QF-PCR, esta discrepancia es debida en la mayoría de los casos a la existencia de mosaicismo placentario (Holgado et al., 2011) y cromosomopatías estructurales importantes (Olgilvie et al., 2005b; Hill et al., 2010).

Según el estudio de Chitty y colaboradores (2006), la QF-PCR como técnica principal de diagnóstico identificaría el 97.9% de anomalías clínicamente significativas aumentando a un 99% si se realizara el cariotipo cómo prueba complementaria, sólo en los casos con una translucencia nucal superior o igual a 4 mm. Esto agilizaría la entrega de los resultados a la pareja, reduciendo también los costes económicos (Chitty et al., 2006).

1.8. DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO.

El principal objetivo del diagnóstico prenatal no invasivo es diagnosticar aneuploidías fetales tales como la trisomía 21, 18, y 13 y cromosomas sexuales sin necesidad de recurrir a la realización de procedimientos invasivos que representan un riesgo de pérdida fetal mediante la identificación de ácidos nucleicos fetales (ADN o ARN) en plasma materno. Actualmente es un método de cribado eficaz para la evaluación del riesgo de las principales aneuploidías (Fairbrother et al., 2013; Vaiopoulos et al., 2013). El ADN fetal está presente en el plasma materno alrededor de un 3-20% del total de ADN libre circulante siendo el 80-90% restante de origen materno (Lun et al., 2008; Nygren et al., 2010).

En 1997, Lo y colaboradores descubrieron la presencia de ADN fetal libre en sangre materna de mujeres embarazadas (Lo et al., 1997), este hecho tan importante abrió una puerta a la investigación ante la posibilidad, de llevar a cabo un diagnóstico prenatal a través de sangre materna sin necesidad de técnicas invasivas para obtener

material genético fetal. Se desconoce el mecanismo por el cual el ADN del feto es liberado al torrente sanguíneo, se piensa que una de las causas puede ser debido a la apoptosis celular (van Wijk et al., 2000; Bischoff et al., 2003). El ADN fetal aumenta conforme avanza la gestación (Illanes et al., 2006) y puede detectarse en plasma materno a partir de la quinta semana (Rijnders et al., 2003). Tras el parto el ADN fetal desaparece de la circulación materna a los pocos minutos (Lo et al., 2005).

Las características del ADN fetal actualmente son poco conocidas, si se sabe que el ADN fetal es más pequeño que el materno. Chan y colaboradores (Chan et al., 2004) han descrito que su presencia en pequeños fragmentos está relacionada con su origen ya que procede de células apoptóticas placentarias que implican que el ADN sea fragmentado para ser liberado a la circulación materna.

Una de las limitaciones para su utilización en el diagnóstico no invasivo ha sido la coexistencia de ADN fetal y materno en el plasma de la madre, sin embargo, gracias a las nuevas tecnologías en la actualidad se lleva a cabo en la práctica clínica con muy buenos resultados.

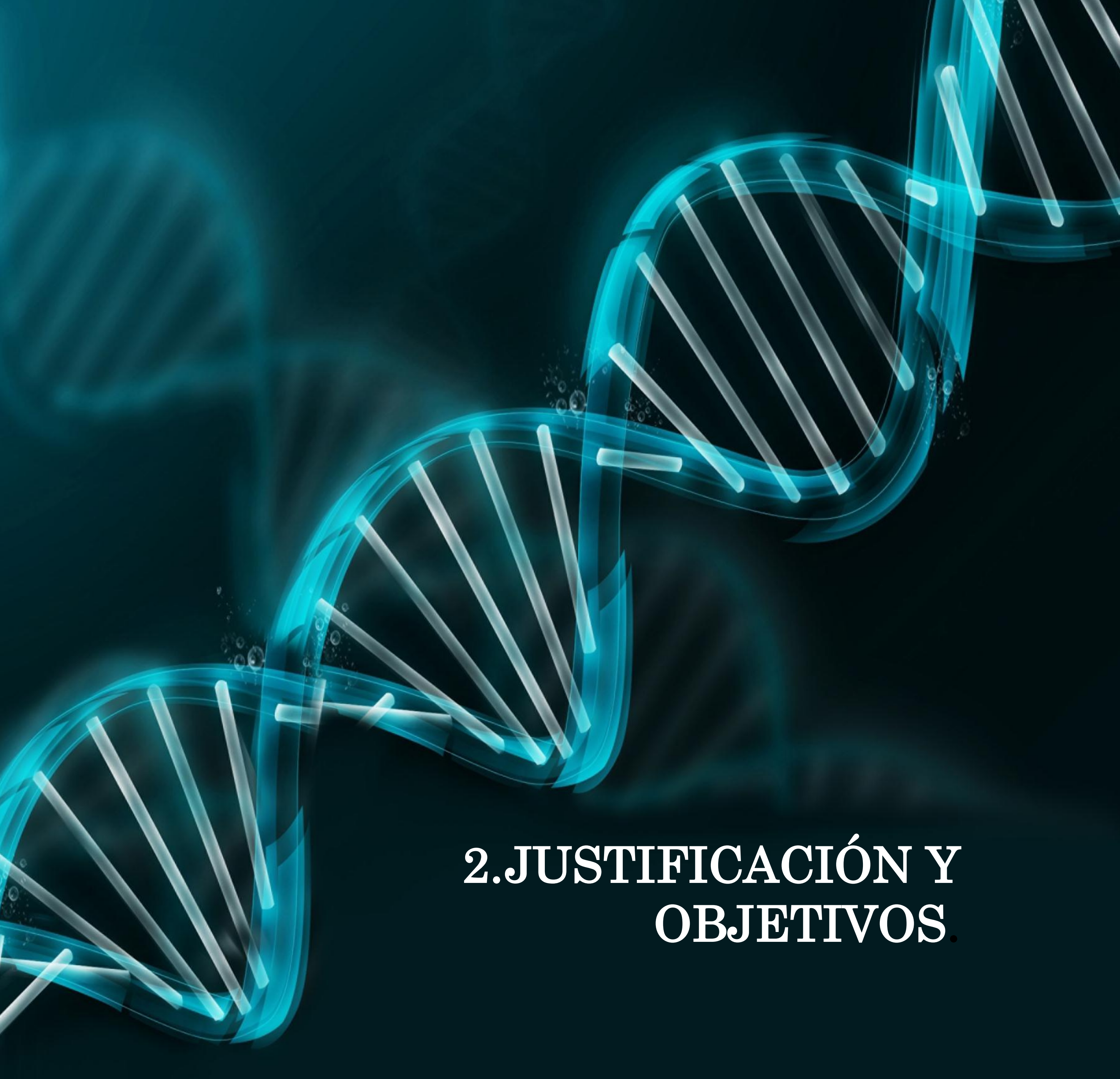
Lo primero que se llevó a cabo en el análisis del ADN fetal fue la detección de secuencias específicas del cromosoma Y en sangre materna exclusivas del feto (Zimmermann et al., 2005; Devaney et al., 2011) para la identificación del sexo fetal. Se analizan las secuencias de los genes SRY y DYS14 en el cromosoma Y, su presencia en sangre materna se asocia a un feto varón y su ausencia a un feto hembra. La detección se lleva a cabo mediante la tecnología de la PCR con una especificidad cerca del 100%.

También tiene utilidad en el diagnóstico de enfermedades ligadas al cromosoma X como el síndrome de X frágil, disfrofia muscular de Duchenne y la hemofilia.

Debido a la coexistencia del ADN materno y fetal las investigaciones se han centrado en cómo identificar este último. Algunos estudios han demostrado que existen zonas del ADN fetal con diferente metilación a la del ADN materno. Esto ha llevado a la identificación de regiones diferencialmente metiladas (DMR) (Papageorgiou et al., 2011).

Recientemente, estudios clínicos han validado el uso de la secuenciación masiva paralela, (del inglés; massive parallel sequencing (MPS)) para la detección prenatal de aneuploidías cromosómicas 21, 13 y 18 a partir del análisis del ADN fetal en plasma materno. Se ha demostrado que es posible construir el mapa genético de todo el genoma del feto y las mutaciones que presenta mediante secuenciación. Estos hechos sugieren que el análisis de ADN fetal en plasma materno desempeñaría un papel cada vez más importante en la práctica obstétrica. Esta técnica presenta una sensibilidad y especificidad mayor de un 99% con una tasa de falsos positivos menor del 0.1%. Esta técnica puede reducir potencialmente los procedimientos de diagnóstico invasivos en un 95%-98% (Chiu et al., 2011; Palomaki et al., 2011; Palomaki et al., 2012; Sparks et al., 2012; Jensen et al., 2013).

El inconveniente actual del diagnóstico prenatal no invasivo es el pequeño porcentaje de falsos negativos (0.1%) que presenta debido a que en ocasiones es complicado extraer el ADN fetal de la sangre materna. Actualmente, el diagnóstico prenatal no invasivo no se considera una prueba de diagnóstico que pueda reemplazar las técnicas invasivas en los embarazos de alto riesgo debido a que su sensibilidad y especificidad no es de un 100%. Es una prueba de cribado muy superior a las disponibles en la actualidad, ya que identifica grupos con mayor riesgo que requieren una mayor investigación por pruebas invasivas (Fairbrother et al., 201; Gratacós y Nicolaides, 2014). Finalmente y después de muchos años de investigación, este método está comercialmente disponible y se lleva a cabo en un número cada vez más elevado de pacientes.



2.JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

El estudio prenatal de aneuploidías mediante métodos de cribado constituye en la actualidad un aspecto muy importante dentro del diagnóstico prenatal de las anomalías congénitas y del control del embarazo. Todavía sigue siendo muy elevado el porcentaje de defectos congénitos constituyendo así un problema sanitario de salud pública en los países desarrollados, dada la mortalidad y morbilidad que conllevan. Una de las causas se debe a que cada vez se retrasa más la edad gestacional, por lo que el diagnóstico prenatal es la única medida preventiva que ofrece información y alternativas a las gestantes y sus parejas. Cada vez es más importante la detección precoz ya que en caso de padecer alguna anomalía cromosómica, si la paciente decide interrumpir el embarazo, minimiza las consecuencias físicas y psicológicas que conlleva esta decisión tan importante.

Ha habido muchos avances en los métodos de cribado a lo largo de los años mejorando cada vez las tasas de detección y disminuyendo considerablemente las tasas de falsos positivos, sin embargo, a pesar de estos grandes avances sigue existiendo un elevado porcentaje de defectos congénitos, para los que se desconocen las causas que los origina. Los factores críticos en una prueba de detección son la capacidad de discriminar entre individuos afectados y no afectados y esto se expresa en términos de la tasa de detección y la tasa de falsos positivos.

Las aneuploidías cromosómicas son uno de los trastornos genéticos más frecuentes en humanos. Se caracterizan por la presencia en el individuo de un número anormal de cromosomas con distintas consecuencias: aborto o nacimiento del bebé con anomalías muy diversas. En general, presentan como denominador común retraso mental en distintos grados. La probabilidad de presentar un trastorno genético aumenta con la edad materna, principalmente en mujeres mayores de 35 años.

El Síndrome de Down o trisomía 21 (47,XX(Y),+21) ha sido uno de los objetivos prioritarios en el diagnóstico prenatal debido a que es la aneuploidía más frecuente en nacidos vivos y la causa más común de retraso mental severo. Le siguen otras aneuploidías como el síndrome de Edwards o trisomía 18 (47,XX(Y),+18), síndrome de Patau o trisomía 13 (47, XX(Y),+13). El otro grupo de aneuploidías son las sexuales que son formas menos severas, como el síndrome de Turner (45, X0) y Klinefelter (47, XXY).

El objetivo principal del cribado de cromosomopatías en el primer trimestre es aumentar lo máximo posible las tasas de detección, incorporando cada vez más nuevos marcadores capaces de detectar fetos aneuploides entre un porcentaje de la población con mayor riesgo de padecer una trisomía, esto supone un avance importante ya que ofrece a los padres un método de cribado efectivo reduciendo la práctica de pruebas invasivas.

El test de cribado establecido en la práctica clínica con mayor tasa de detección y menor tasa de falsos positivos se llama “test combinado del primer trimestre” y engloba parámetros bioquímicos analizados en el suero materno como la medida de la fracción β libre de la gonadotrofina coriónica humana (β-hCG), la proteína plasmática placentaria A (PAPP-A) y parámetros ecográficos como la medida de la translucencia nucal (TN).

En la realización de este trabajo se han utilizado también marcadores ecográficos secundarios como el ductus venoso, flujo tricuspídeo y la valoración del hueso nasal. La introducción de estos nuevos marcadores ecográficos mejora los resultados del cribado, disminuyendo la tasa de falsos positivos y aumentando la tasa de detección. Para la medición de estos nuevos marcadores se requiere de personal cualificado. Se acepta que un cribado poblacional debe tener como mínimo una tasa de detección del 75% con una tasa de falsos positivos del 5%.

La QF-PCR y el cariotipo son técnicas usadas en el diagnóstico de anomalías cromosómicas, la ventaja de la primera radica en que permite la detección rápida de aneuploidías más frecuentes (13, 18, 21, X e Y), en tan solo 24h. El problema de la utilización del cariotipo es que el tiempo entre la obtención de la muestra y el resultado es de 2 a 3 semanas siendo un periodo suficientemente largo que produce gran ansiedad para los padres, además los cultivos pueden no tener crecimiento de los amniocitos o pueden presentar algún tipo de contaminación. Gran parte de las discrepancias entre la QF-PCR y el cariotipo son debidas a la presencia de mosaicismos y anomalías estructurales en los cromosomas.

La política de diagnóstico prenatal actual es llevar a cabo la realización de ambas técnicas en casos de prueba invasiva. Estudios retrospectivos de evaluación del

efecto clínico de un cambio en esta política consideran realizar la técnica QF-PCR como método de análisis principal en pacientes de bajo riesgo de cromosomopatías y sin indicaciones anormales en ecografía y añadir el cariotipo convencional como técnica complementaria sólo en gestantes con hallazgos ecográficos anormales, translucencia nucal aumentada y/o historia genética de anomalía cromosómica.

Esta estrategia reduce los costes económicos, evita resultados ambiguos del cariotipo y proporciona una entrega rápida de resultados, permitiendo una actuación temprana en caso de la necesidad de interrumpir el embarazo.

Este cambio de política ha sido un punto de controversia y debate aún sin resolver desde hace varios años generando una gran preocupación, debido a que la sustitución del cariotipo podría traducirse en un número considerable de nacidos vivos con problemas físicos y/o mentales, y representar una disminución sustancial en la calidad de los resultados de las pruebas prenatales

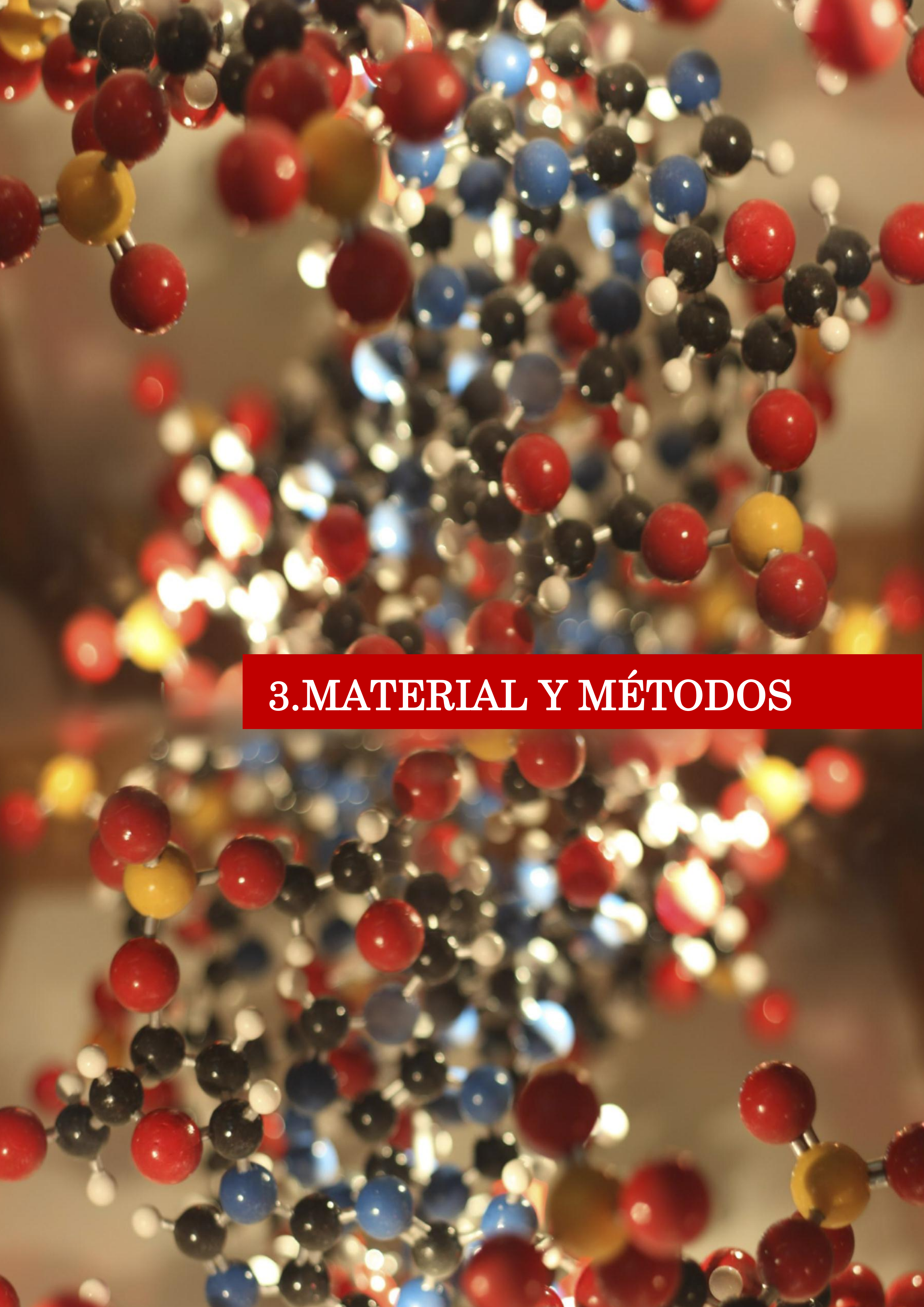
De acuerdo con lo anteriormente expuesto nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Valorar la eficacia del método de cribado combinado en el primer trimestre de gestación para la detección de anomalías cromosómicas utilizando la aplicación integrada de la translucencia nucal, los marcadores ecográficos secundarios (hueso nasal, regurgitación tricuspídea y el ductus venoso) y los marcadores bioquímicos maternos (fβ-hCG y PAPP-A).

2. Comparar la eficiencia de la QF-PCR frente al cariotipo convencional en la detección de anomalías cromosómicas en muestras prenatales obtenidas mediante procedimientos invasivos (biopsia corial y/o amniocentesis).

3. Determinar el porcentaje de anomalías cromosómicas clínicamente significativas que no serían detectadas por una política en la que la QF-PCR fuese el método principal de análisis, reservando la realización del cariotipo para los casos con un aumento de la translucencia nucal (TN) y/o hallazgos ecográficos anormales.

4. Estimar los costes económicos en caso de llevarse a cabo esta nueva política de diagnóstico.



3.MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Se han estudiado un total de 4629 pacientes con gestación simple de un total de 5300 en el período comprendido entre Mayo de 2009 a Abril de 2011, provenientes del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada. Por lo tanto, 671 pacientes que se atienden en nuestro hospital fueron excluidas del estudio por las siguientes razones:

- Pacientes que acuden para el control del embarazo superando las 14 semanas. A estas pacientes se les informa que no es posible realizar el test combinado del primer trimestre por encontrarse fuera de plazo. El segundo motivo es debido a pacientes que vienen de otro centro o provincia para la realización de la prueba invasiva en nuestro centro y que no constan en nuestra base de datos ya que el control del embarazo lo están realizando en un hospital distinto.

- Pacientes que en nuestra base de datos no nos constan el control del embarazo.

- Gestantes que se han realizado el cribado en nuestro centro y finalizan la gestación en un centro distinto.

- Un porcentaje pequeño de pacientes que en un determinado momento de la gestación, o durante el parto, son atendidas en el centro, pero no pertenecen a nuestra Área Sanitaria

- Gestaciones múltiples.

En el presente estudio a toda la población gestante se le ha realizado el Programa de cribado Prenatal de anomalías cromosómicas mediante el **―cribado combinado del primer trimestre”** (semanas de gestación 11-13^{+}6) según criterios de la Fetal Medicine Foundation, en el que se establece de forma individualizada el riesgo de cada gestante de tener un feto afecto por una anomalía cromosómica, mediante la combinación de la edad materna y una serie de marcadores bioquímicos (PAPP-A y β-hCG libre) y ecográficos (translucencia nucal y marcadores ecográficos secundarios: ductus venoso, flujo tricuspídeo y valoración del hueso nasal). Las pacientes deben firmar un consentimiento para poder participar en el programa de cribado. El control y finalización de la gestación de las pacientes se ha llevado a cabo en nuestro hospital.

En todos los casos se ha investigado el resultado tras el nacimiento mediante la base de datos del Servicio de Neonatología y por entrevista telefónica hablando directamente con las madres/padres. Todos los datos fueron recopilados de la base de datos de Omega 3000 (Roche diagnostics®), Archinet y Astraia.

3.2. CRIBADO COMBINADO DEL PRIMER TRIMESTRE.

En la Unidad de Obstetricia del Hospital Clínico Universitario San Cecilio la primera visita prenatal se realiza entre las 11 y $13^{+}6$ semanas de gestación. Esta visita es muy importante ya que se realiza la historia clínica de la paciente y se realiza la visita obstétrica y la ecográfica de primer trimestre incluyendo el **"Test combinado de cromosomopatías".** En la mayoría de los casos es el médico de Atención Primaria o la matrona quienes ven en primera instancia a la gestante y llevan a cabo la entrega toda la información (cartilla para la embarazada) y los trámites pertinentes. Desde la consulta de atención primaria se solicita la petición analítica de los marcadores bioquímicos (PAPP-A y β-hCG libre) del cribado del síndrome de Down y otras cromosomopatías.

En nuestro hospital el protocolo de revisión es el siguiente:

- I trimestre: Semana 11-$13^{+}6$.
- II Trimestre: Semana 20-22.
- III Trimestre: Semana 32-34.
- Consulta de Bienestar fetal: Semana 40.

La evaluación del cálculo de riesgo de cromosomopatías consistente en: la medición de la translucencia nucal y de los 3 marcadores ecográficos secundarios (ductus venoso, flujo tricuspídeo y valoración del hueso nasal), además de la bioquímica del primer trimestre (PAPP-A y β-hCG libre en suero materno). Todos estos marcadores se utilizan para calcular el riesgo individual de la paciente.

3.2.1. Determinación de los marcadores ecográficos.

El ecógrafo empleado es un modelo Xario XG de la marca Toshiba. Se realiza ecografía transabdominal a todas las gestantes. Los ginecólogos/as encargados de realizar las ecografías del cribado del primer trimestre, son personal cualificado y adiestrado tanto en ecografía obstétrica como en el manejo de la información prenatal. Todos los marcadores ecográficos se realizan de acuerdo a las recomendaciones de la Fetal Medicine Foundation. En la base de datos Astraia se recoge toda la información obtenida de la paciente (Figura 30).

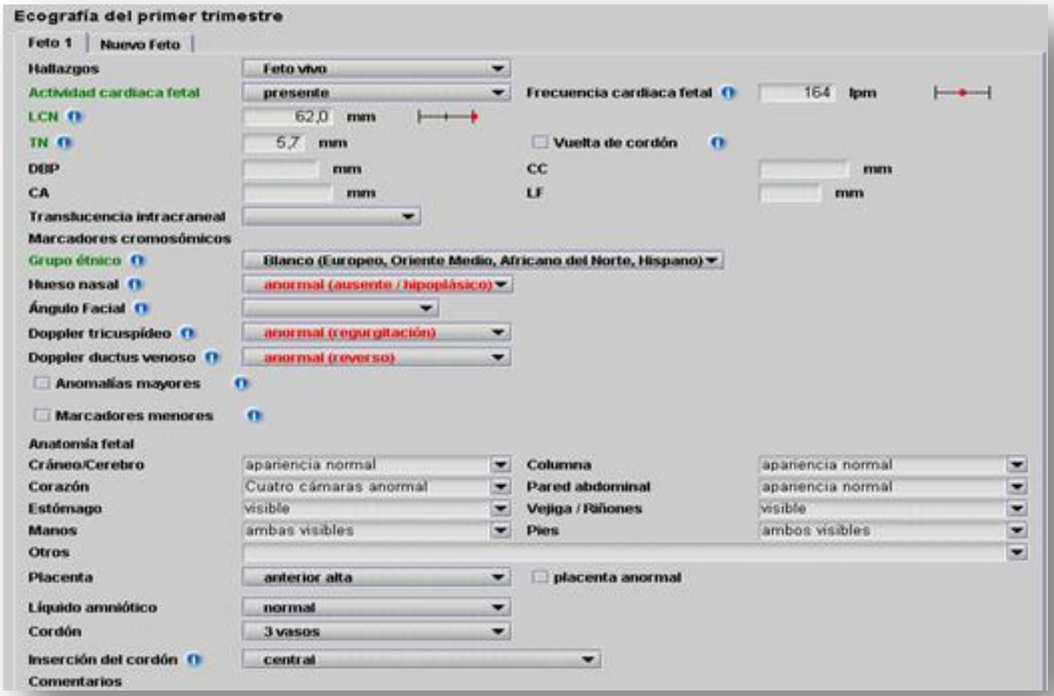


Figura 30. Características maternas y fetales registradas en la base de datos Astraia**.**

Además, en la ecografía de primer trimestre se realiza la datación de la gestación (según la medida de la longitud cráneo-caudal del feto) y visualización general del feto y de las estructuras gestacionales que consiste en:

- Descartar malformaciones mayores en el sistema genital interno de la madre.
- Evaluación de la actividad cardiaca fetal y del número de fetos.
- Evaluación placentaria y del líquido amniótico.
- **Cráneo**: evaluación de la integridad y la forma normal del cráneo
- **Encéfalo**: observación de la forma de mariposa de los plexos coroideos
- **Cara:** observación del hueso nasal y vista de las órbitas
- **Tórax.**
- **Corazón:** observación de las cámaras.
- **Abdomen:** observación del estómago, riñones y vejiga
- Columna vertebral: vista sagital y media para revelar la alineación normal de las vértebras y la piel que cubre toda la columna vertebral
- **Placenta:** posición
- **Cordón umbilical:** número de vasos e inserción normal de este en la pared abdominal.
- **Líquido amniótico.**
- **Miembros:** fémur, tibia, peroné, húmero, radio, cúbito. Las manos y los pies. Observación de los movimientos y las articulaciones.

3.2.1.1. Medida de la Longitud Cráneo-Caudal.

La longitud cráneo-caudal fetal (LCC) se utiliza para determinar la edad gestacional del feto (Figura 31). La edad gestacional medida por la fecha de la última regla (FUR) es tenida en cuenta en la historia pero la datación exacta se realiza por LCC, aunque existan sólo uno o dos días de discrepancia con la fecha de la FUR. La medida fetal debe estar entre 45 y 84 mm.

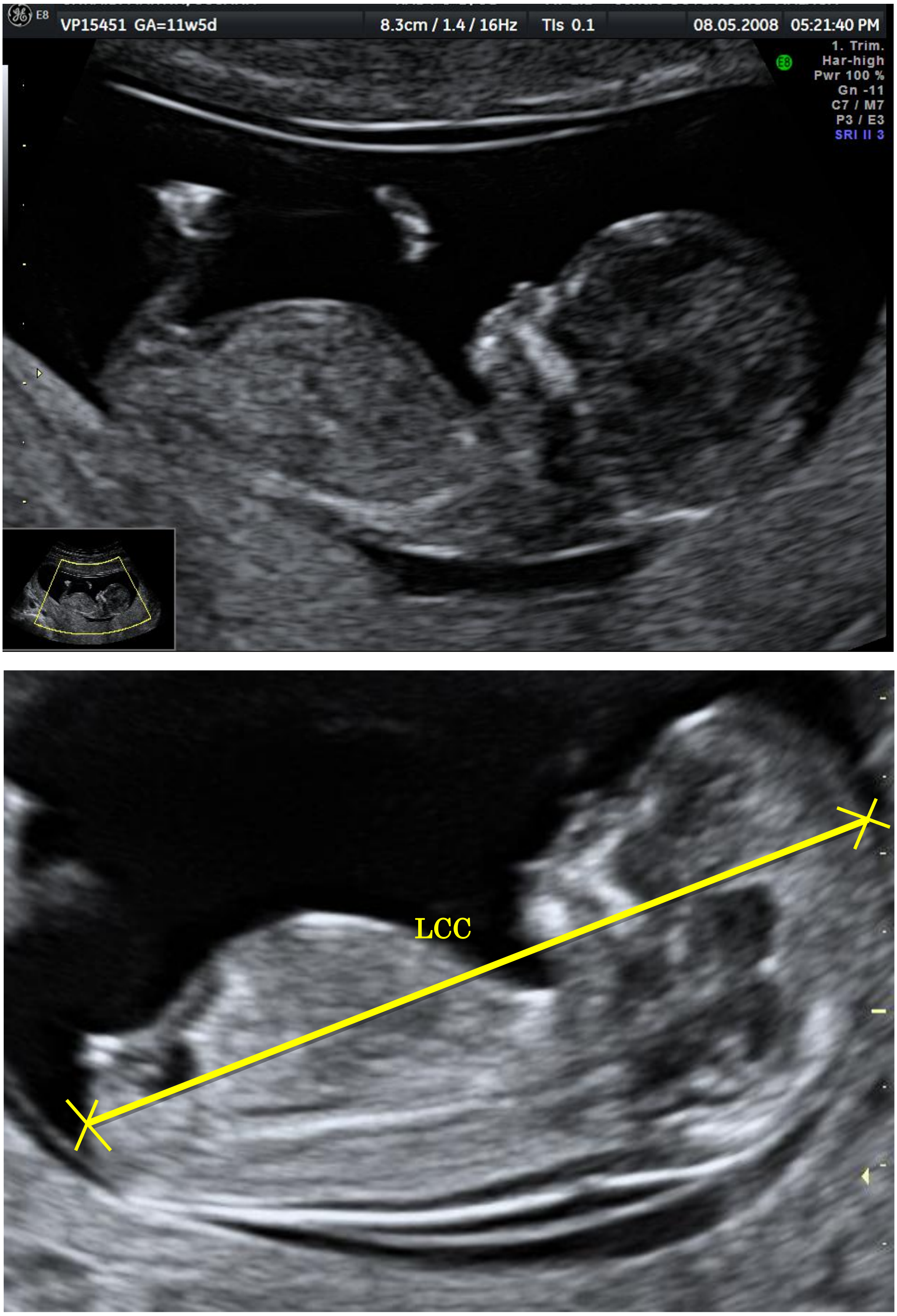


Figura 31. Medida de la LCC de un feto situado en posición neutral.

3.2.1.2. Medida del grosor de la Translucencia Nucal.

Es importante señalar a la hora de la medida de la TN fetal que esta aumenta con la longitud cráneo-caudal (LCC). Para su medida debe obtenerse un buen corte sagital del feto (Figura 32).

Figura 32. Imagen de la translucencia nucal en posición neutral como se ve en el primer trimestre de gestación.

1. La edad gestacional óptima para la medida de la TN fetal es entre las 11–13^{+}6 semanas (LCC mínimo es de 45 mm y la máxima de 84 mm).
2. El ecógrafo utilizado tiene función de video-loop y calipers. La cabeza fetal y el tórax superior deben estar incluidos en la imagen para la medida de la TN.
3. El feto debe estar en posición neutral.
4. La cabeza del feto debe estar alineada con la columna vertebral y no debe ser hiperextensión o flexión (Figura 33).

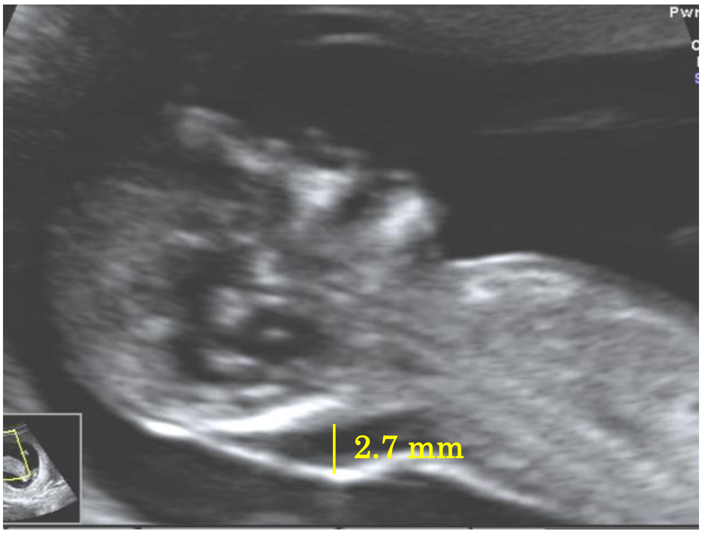


Figura 33. Imagen de la translucencia nucal en posición de hiper-extensión fetal que aumentaría la medida de la misma.

5. Hay que tener cuidado para no confundir entre la piel fetal y el amnios, ambas estructuras aparecen como finas membranas en este momento de la gestación. (esto se puede solucionar con movimientos fetales espontáneos, o a veces la ginecóloga le pide a la paciente toser para que el feto pueda separarse del amnios)
6. La amplificación debe ser la máxima, el feto debe ocupar toda la imagen tal que cada mínimo movimiento de los calipers produzca un cambio de 0,1 mm en la medición. El perfil fetal tiene que verse perfectamente, por ello, se amplifica tanto la imagen para que solo la cabeza y la parte superior del tórax ocupen toda la pantalla.
7. Debe medirse el máximo grosor de translucencia subcutánea entre la piel y el tejido que cubre la columna cervical. Los calipers deben colocarse sobre las líneas que definen el grosor de la TN (borde interno de las líneas)
8. Deben obtenerse al menos 3 medidas y considerar la mayor.

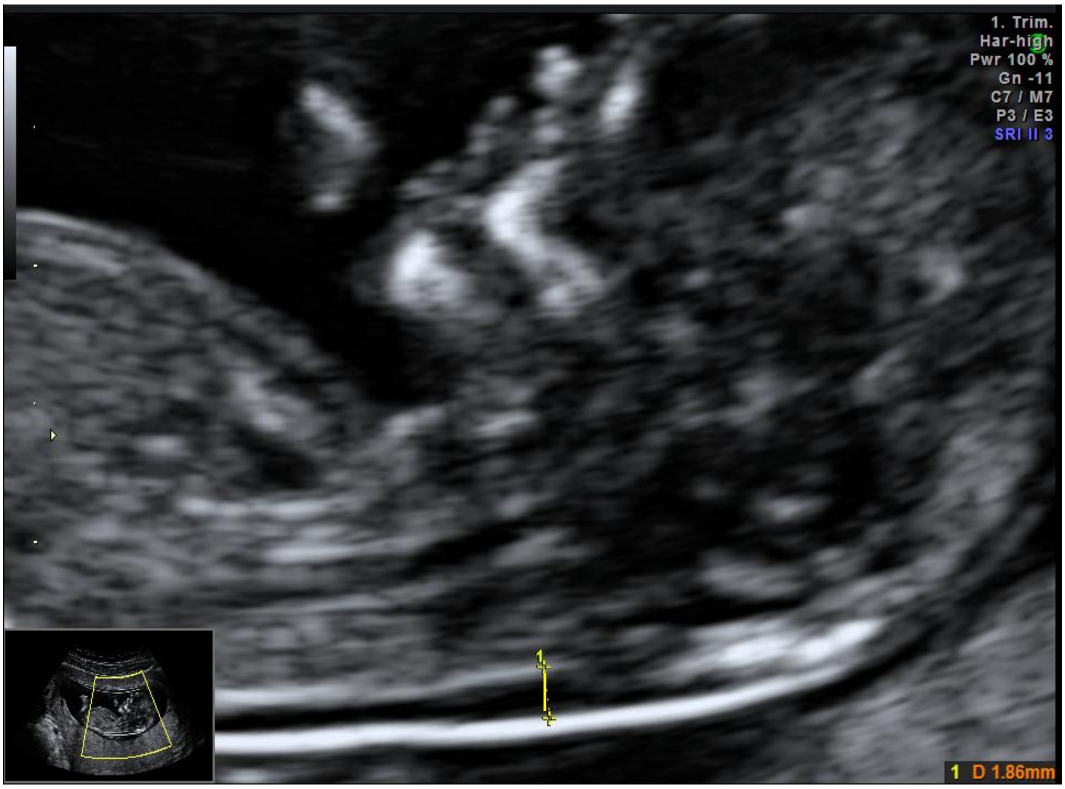


Figura 34. Imagen de la translucencia nucal de un feto normal como se ve en el primer trimestre de gestación.

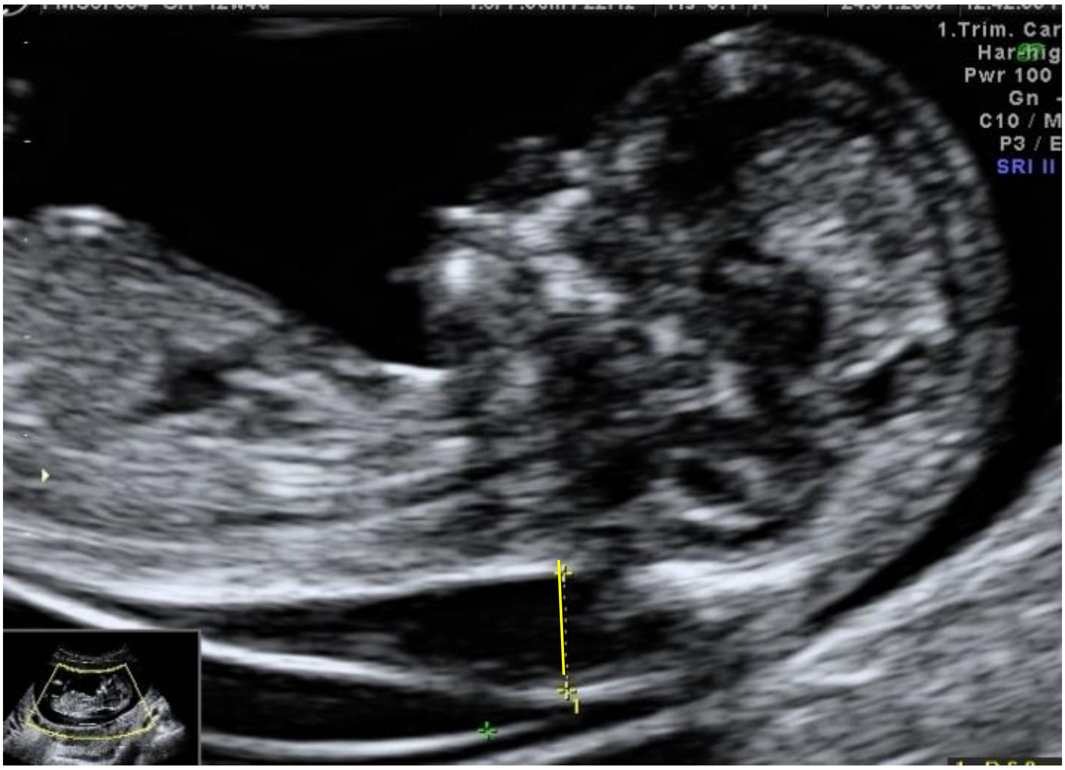


Figura 35. Imagen de la translucencia nucal aumentada en un feto con trisomía 21, como se ve en el primer trimestre de gestación.

3.2.1.3. Valoración del hueso nasal.

Para la correcta observación del hueso nasal:

1. El hueso nasal se visualiza ecográficamente a las 11-13^{+}6 semanas de gestación (LCC entre 45 y 84 mm, se visualiza mejor con un LCC de entre 65 y 74 mm) (Figura 36).
2. Se requiere la magnificación de la cabeza y la mitad superior del tórax.
3. El transductor ecográfico debe estar paralelo a la dirección de la nariz y la sonda debe moverse lateralmente a ambos lados de la nariz fetal. Deberían verse tres líneas diferentes a nivel de la nariz fetal:

- Una línea superior que representa la piel
- Una linea inferior, más ecogénica que la piel que lo recubre y más gruesa, que representa el hueso nasal
- Y una tercera línea en frente del hueso nasal y a un nivel más alejado de la piel fetal, que representa la punta de la nariz

El hueso nasal se considera presente si es más ecogénico que la piel que lo recubre (Figura 36) y ausente si no es visible o es menos ecogénico que la piel (Figura 37).

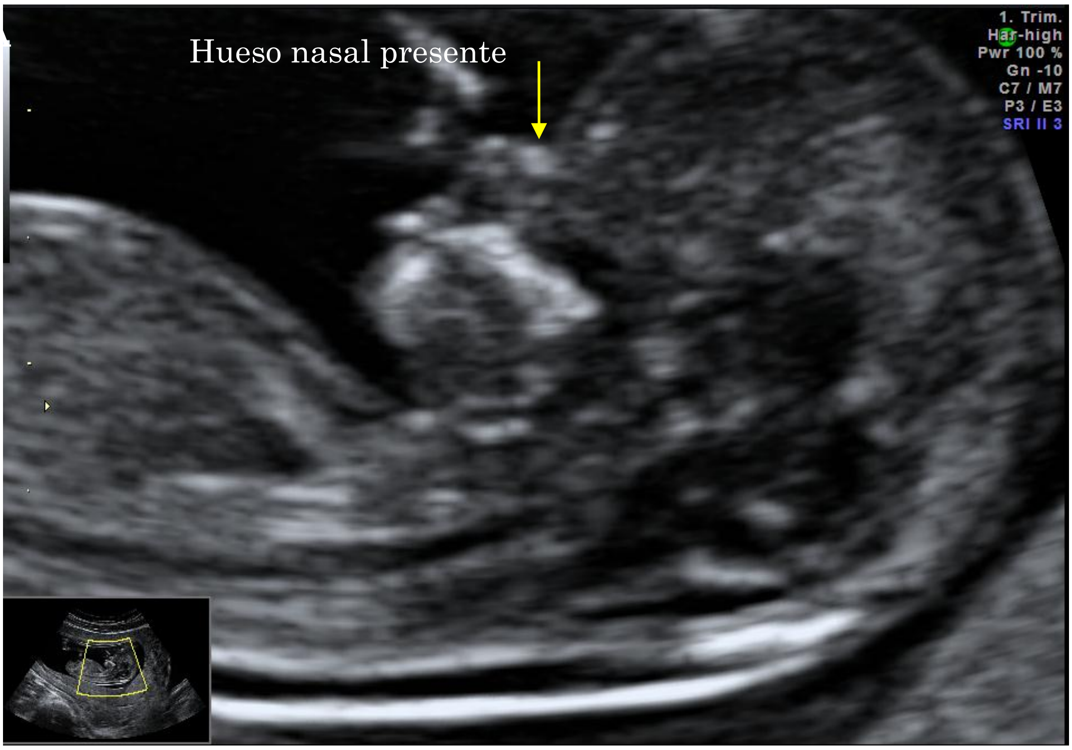


Figura 36. Imagen sagital media apropiada para evaluar el hueso nasal fetal en la semana 12 de gestación. Feto normal con hueso nasal presente

Figura 37. Feto con trisomía 21 con ausencia del hueso nasal.

3.2.1.4. Regurgitación tricuspídea.

La FMF ha establecido los criterios diagnósticos para definir la presencia de regurgitación tricuspídea:

1. Para su valoración el feto no debe moverse. El tamaño de la imagen debe ser ampliado para que el tórax fetal ocupe toda la pantalla. Se obtiene una visión de las 4 cámaras (Figura 38).

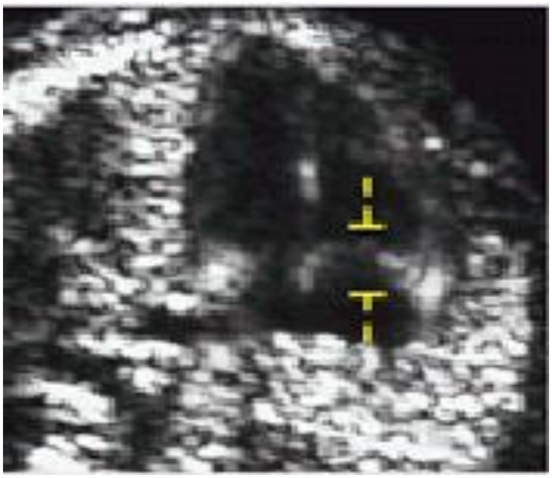


Figura 38. Imagen ecográfica que muestra la vista apical de las cuatro cámaras del corazón a las 12 semanas.

2. Se coloca el cursor del Doppler pulsado, abierto entre 2 a 3 mm, sobre la válvula tricúspide con un ángulo menor de 30° respecto a la dirección del flujo.
3. La regurgitación tricuspídea, a esta edad gestacional, se diagnostica cuando dura más del 50% del sístole, alcanzando velocidades por sobre los 60 cm/seg (Figura 39). Este último criterio se debe a que los flujos por los grandes vasos, a esta edad gestacional, no superan los 50 cm/seg, con los cuales se debe establecer el diagnóstico diferencial.

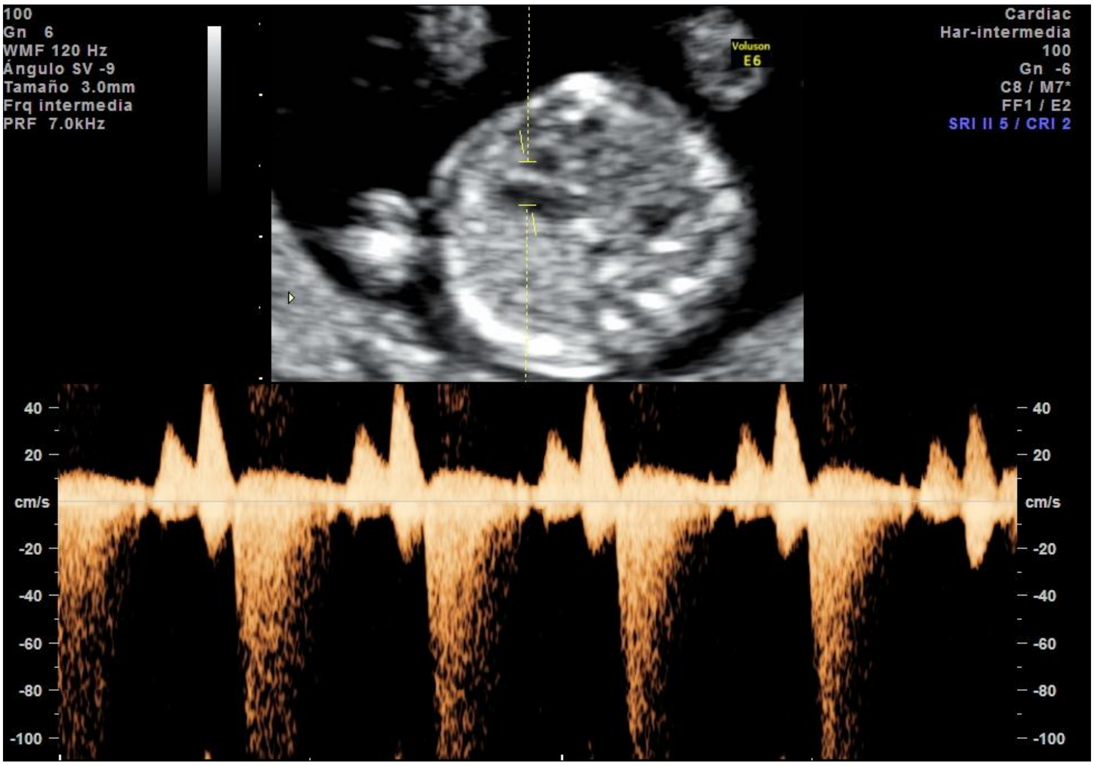


Figura 39. Regurgitación tricuspídea en un feto con trisomía 21.

3.2.1.5. Valoración del ductus venoso.

Para la correcta valoración del flujo en el ductus venoso:

1. El feto no debe estar en movimiento.
2. Magnificación del tórax y abdomen fetal ocupando toda la pantalla.
3. Hay que usar el Doppler color para localizar la vena umbilical, el ductus venoso, la aorta y el corazón fetal (Figura 40). La ventana del doppler pulsado debe ser pequeña (0.5-1mm) para evitar contaminación de vasos adyacentes. El ángulo de insonación debe ser menor de 30 grados. El filtro debe ser de baja frecuencia (50-70 Hz) para permitir la visualización de la onda completa y la velocidad de barrido debe ser alta (2-3 cm/s).
4. La onda obtenida puede ser onda-a positiva (normal) (Figura 40) o reversa (anormal) (Figura 41).

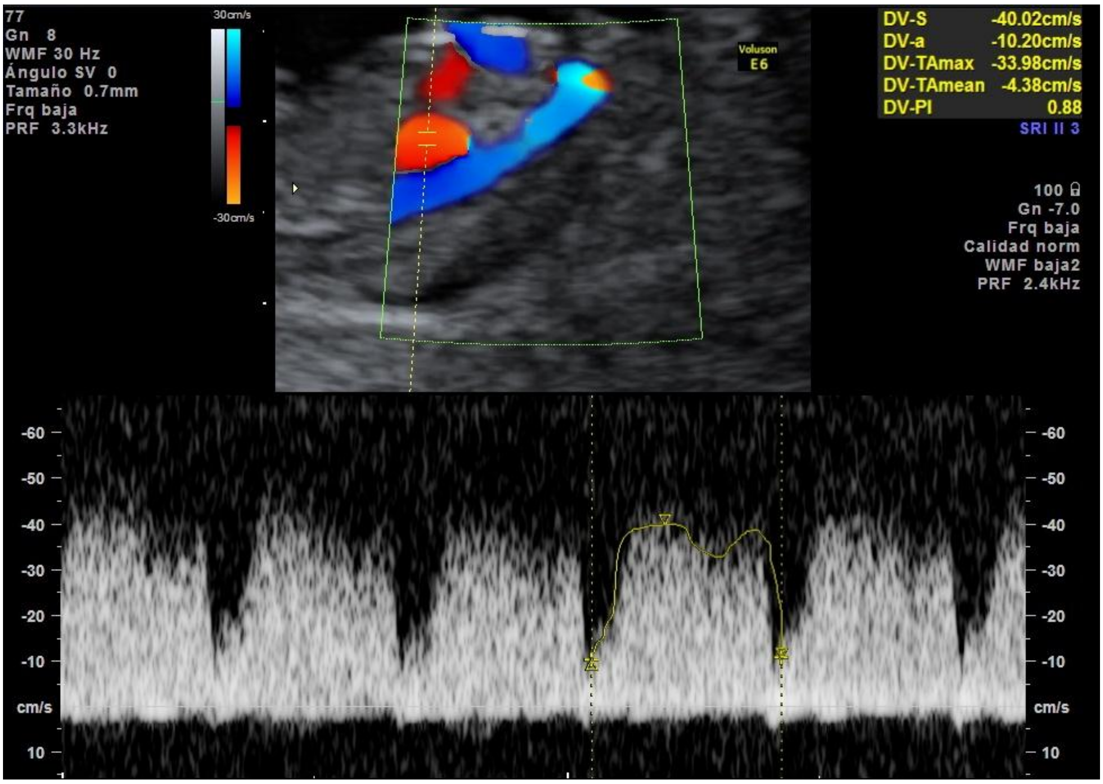


Figura 40. Onda a normal del ductus venoso en un feto normal en el primer trimestre de gestación.

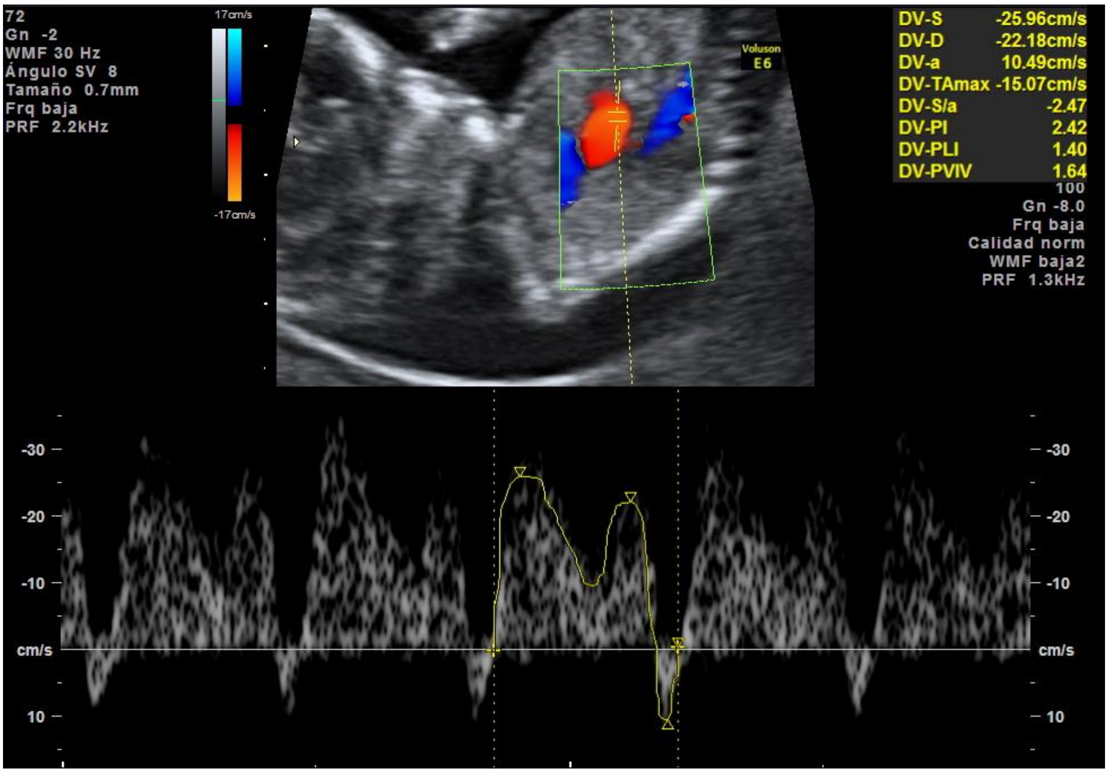


Figura 41. Onda a invertida del ductus venoso flujo invertido (anormal) en un feto con trisomía 21 en el primer trimestre de gestación.

3.2.2. Determinación de los marcadores bioquímicos.

El análisis de la proteína plasmática A asociada al embarazo y la β-hCG libre se realiza en sangre periférica de las gestantes, entre las semanas de gestación 11-13^{+}6. Las muestras de sangre se centrifugan a 3000 rpm 7 minutos para obtener el plasma para su análisis. Las muestras fueron analizadas con el analizador Immulite® 2000 de Siemens (Diagnostic Products).

Es muy importante la correcta recogida, transporte y procesado de las muestras. Se realiza controles sobre la precisión de las determinaciones, tantos internos como externos, estos últimos preferentemente de agencias internacionales bien establecidas (UK NEQAS for Maternal Serum Screening).

3.2.2.1. Proteína A Plasmática Asociada al embarazo (PAPP-A).

Se determinó mediante ensayo enzimático inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida.

Reactivos:

- Fase sólida (bola) recubierta por anticuerpo monoclonal murino anti PAPP-A libre (anticuerpo específico).
- 11.5 ml de fosfatasa alcalina (de intestino de ternera) conjugada con monoclonal murino anti PAPP-A en solución tampón.

Técnica:

La muestra del paciente se incuba junto con la bola recubierta con el anticuerpo monoclonal murino anti-PAPP-A el tiempo necesario para que la muestra del paciente se una al anticuerpo. Se realizan una serie de lavados por centrifugación para eliminar los anticuerpos que no se hayan fijado. Se añade un segundo anticuerpo monoclonal murino anti-PAPP-A marcado con fosfatasa alcalina (de intestino de ternera) en solución tampón y tras un proceso de incubación se une a la PAPP-A inmovilizada formando el complejo de anticuerpo tipo sándwich. El conjugado no unido se elimina mediante lavados por centrifugación. Finalmente se añade el sustrato

quimioluminiscente. La señal que se genera es la lectura colorimétrica del producto final coloreado.

Volumen requerido: 10 μl se suero o plasma.

Limitaciones: anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas de los componentes del ensayo provocando interferencias con los inmunoanálisis in vitro. Las muestras de los pacientes que frecuentemente están expuestos a animales o a productos séricos animales pueden presentar este tipo de interferencia que potencialmente ocasione un resultado anómalo.

3.2.2.2. Fracción beta libre de la gonadotropina coriónica humana (fB-hCG)

Se determinó mediante un ensayo secuencial inmunométrico con dos sitios de unión quimioluminiscente en fase sólida.

Reactivos:

- Fase sólida (bola) recubierta por anticuerpo monoclonal murino anti β-HCG libre (anticuerpo específico). Consiste en dos reactivos:
- Tampón de matriz proteica.
- Anticuerpo policlonal de cabra anti β-HCG Libre marcado con fosfatasa alcalina (de intestino bovino), en solución tampón.

Técnica:

La reacción se da en dos ciclos:

1º ciclo: La muestra del paciente y el tampón se incuban junto con la bola durante 30 minutos. Durante este tiempo, la β-hCG libre de la muestra del paciente se une al anticuerpo monoclonal murino anti β-hCG libre de la bola. Se realizan una serie de lavados por centrifugación para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.

2º ciclo: El anticuerpo policlonal de cabra anti β-hCG libre marcado con fosfatasa alcalina se añade al tubo de reacción original y se incuba durante otros 30 minutos. El anticuerpo policlonal de cabra anti β-hCG libre marcado enzimáticamente se une a la β-hCG inmovilizada formando el complejo de anticuerpo tipo sándwich. El conjugado enzimático no unido se elimina mediante lavados por centrifugación.

Finalmente, se añade el sustrato quimioluminiscente sobre el que la enzima fosfatasa alcalina actuará dando lugar a una reacción. La señal se genera en proporción a la enzima unida. Lectura colorimétrica del producto final coloreado.

Volumen requerido: 5 µl de suero. Libre de hemólisis.

3.2.2.3. Cálculo de los MoM de los parámetros bioquímicos.

Hay que tener en cuenta que los marcadores bioquímicos varían con el tiempo de gestación en el suero materno, por ello hay que transformarlos a múltiplos de la mediana (MoM) corregidos por distintos parámetros.

El programa Priscav.4.0.15.9 s de DPC Dipesa® calcula los MoM de la PAPP-A y la β-hCG libre y son ingresados directamente en el programa Astraia (Figura 42) debido a que no disponemos de uno de los métodos bioquímicos aprobados por la FMF (Brahms Kryptor, Perkin-Elmer, Delfia Manual y Autodelfia).

Figura 42. Los múltiplos de la mediana (MoM) de la β-hCG libre y la PAPP-A son ingresados directamente en el programa Astraia.

Los MoM de los marcadores bioquímicos deben ser corregidos para las características propias de cada embarazada. En el Hospital clínico San Cecilio los factores de corrección son:

- Peso materno
- Origen étnico
- Corionicidad en caso de gemelos
- Hábito de fumar, si o no (si se dice que abandono el cigarrillo o se desconoce si fuma, las entradas son tratadas como ―no" para el cálculo de MoM)
- Inducción de la ovulación
- Paridad

Si el cálculo de las medianas y la conversión a MoM de los distintos parámetros se hace correctamente, el valor esperable de la mediana de los MoM para una población amplia debe ser 1.

3.3. CÁLCULO DEL RIESGO INDIVIDUAL DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS.

El cálculo de riesgo se realizó a través del programa informático Astraia acreditado por la Fundación de Medicina Fetal de Londres (Figura 43). Este programa establece de forma individual el riesgo que tiene cada gestante de tener un hijo afecto con alguna anomalía cromosómica (Trisomía 21, 18 y 13).

Para calcular el riesgo en términos de probabilidad se introducen los resultados de los marcadores bioquímicos y ecográficos de la gestante en el programa informático y aquellas variables como edad, peso, raza, consumo de tabaco, diabetes, embarazo gemelar o por fecundación in vitro, que puedan influir en el cálculo del riesgo. Toda gestante tiene un riesgo a priori de tener un feto afecto por anomalía cromosómica que depende de la edad materna y la edad gestacional.

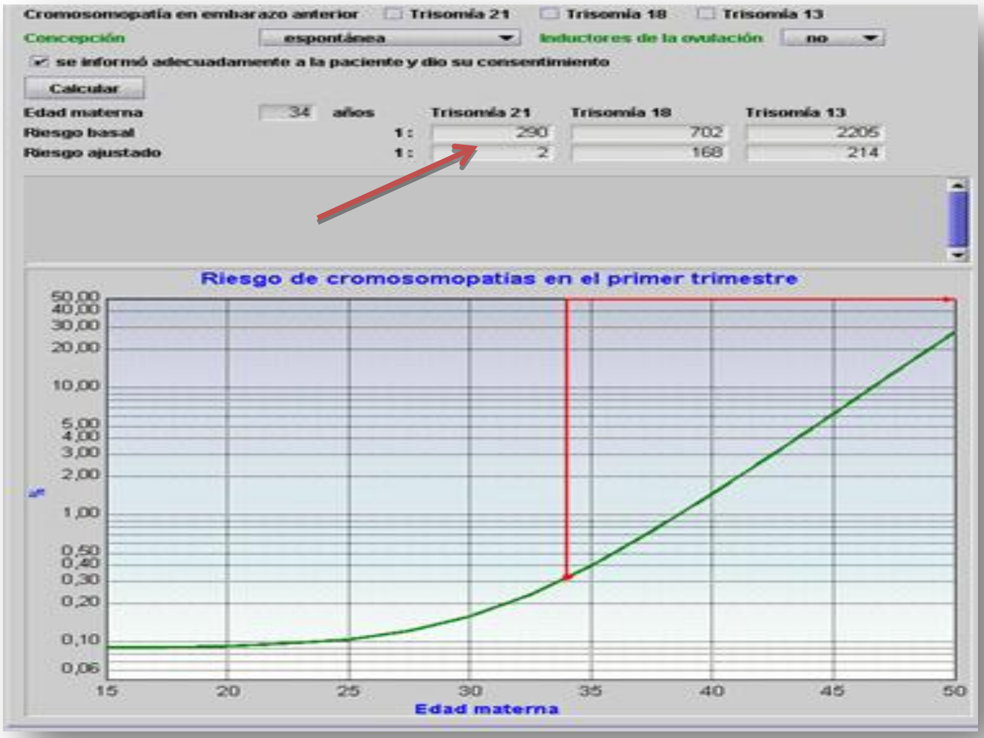


Figura 43. Cálculo del riesgo individual de una paciente de padecer una trisomía 21, 18 y 13 mediante el programa Astraia.

Para conocer el riesgo individual de la gestante es necesario multiplicar este riesgo a priori por una serie de cocientes de probabilidad que dependen de los resultados de las diferentes pruebas que se le han realizado a la gestante. El cociente de probabilidad se calcula dividiendo el porcentaje de fetos cromosómicamente anormales entre el porcentaje de fetos cromosómicamente normales.

El poder discriminativo de los marcadores de cromosomopatías es diferente a lo largo de la gestación, su tasa de detección dependerá en la semana de gestación en la que se realice su determinación. Su utilidad depende de la amplitud de la diferencia de su distribución en embarazos afectados y no afectados, ya que de dicha diferencia depende su poder discriminativo.

Como punto de corte de riesgo hemos utilizado 1 en 270 basándose en las recomendaciones de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO). Toda gestante con un valor debajo de este punto de corte establecido significará que tiene un

riesgo bajo de cromosomopatía fetal, continuando así con un control de embarazo normal. Si el valor está por encima del punto de corte establecido, indica un riesgo alto de cromosomopatía fetal ofreciéndole la posibilidad de realización de una prueba invasiva para confirmar el diagnóstico.

De los 4629 cribados se han seleccionado aquellas gestantes con un riesgo elevado de padecer alguna anomalía cromosómica. Se ha utilizado como punto de corte un riesgo de 1/270 expresado en el momento del cribado. En nuestro centro las indicaciones para realizarse un procedimiento invasivo son:

- Existencia de marcadores ecográficos sugestivos de cromosomopatías.
- Hijo/a previo y/o historia familiar con alteración cromosómica.
- Padre/madre con anomalía cromosómica balanceada.
- Ansiedad de los padres.

3.4. TÉCNICAS INVASIVAS.

En la consulta de diagnóstico prenatal la ginecóloga/o informa a la paciente de la técnica que se le va a aplicar, cuáles son sus objetivos y sus complicaciones. Para realizar una solicitud de estudio genético se precisa que se adjunte correctamente completado el volante de solicitud y el consentimiento informado. La gestante firma el consentimiento informado antes del procedimiento en el que se detalla de forma comprensible los riesgos y las limitaciones de la técnica. Es importante preguntar a las pacientes su RH ya que debe administrarse una dosis de inmunoglobulina anti-D en caso de que las pacientes sean RH negativo.

3.4.1. Biopsia de las vellosidades coriales.

La gestante se coloca en posición decúbito supino para la realización de la técnica. Se realiza una exploración ecográfica vía transabdominal para identificar el lugar de punción más adecuado. La zona de la punción se limpia con una gasa impregnada de alcohol antiséptico y se inyecta anestesia local (Figura 44A). Guiada

ecográficamente se introduce una aguja de 18 gauge y 15 cm de longitud hasta el corion (Figura 44B, C). Se extrae el interior de la aguja (estilete o trócar) y seguidamente se conecta a través de una alargadera o prolongador de unos 10 cm una jeringa de 20 ml con 5 ml de heparina para obtener el material (Figura 44D). La aguja de aspiración se introduce repetidamente hasta conseguir suficiente tejido. A continuación se desconecta la jeringa con el prolongador y se extrae la aguja bajo la supervisión ecográfica.

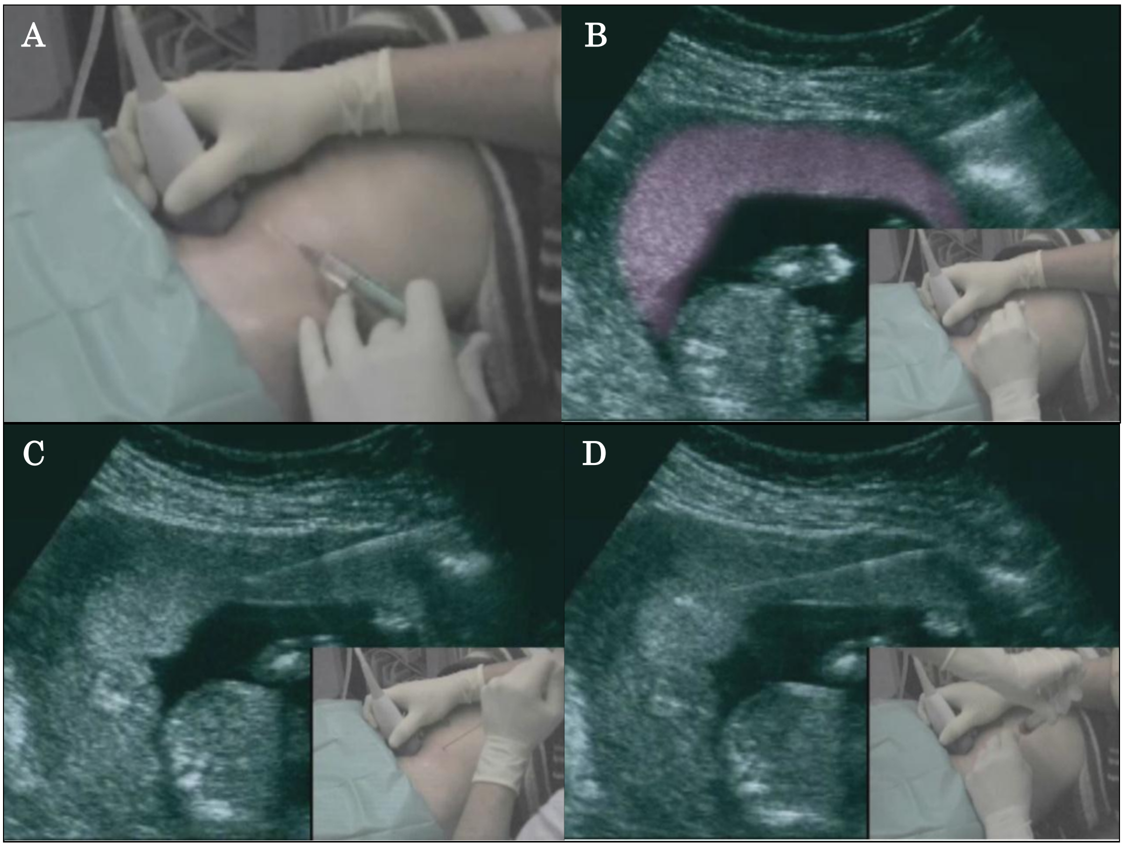


Figura 44. Técnica de Biopsia corial (Fuente: http://www.fetalmedicine.com)

Finalmente se observa el material extraído (Figura 45), para ello se recoge en una placa de Petri y se observa con la lupa comprobando que haya suficiente cantidad de muestra (se necesitan 15 mg), ausencia de decidua y que las vellosidades presenten buena vascularización y no estén deterioradas. Se lleva una pequeña cantidad de vellosidad corial a dos tubos de transporte diferentes.

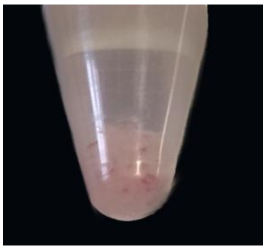


Figura 45. Material extraido después de la realización de la biopsia corial.

Condiciones de recogida de las muestras de vellosidades coriónicas:

- Esterilidad
- Selección adecuada de la muestra
- >15 mg
- Rechazo de la decidua
- El medio de transporte es un tampón fosfato salino PBS 1x (1ml).
- Es una solución acuosa y salina (isotónica) que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio (regulador de pH) (9 ml). Lo facilita el laboratorio. Estéril y con tapón de rosca.

3.4.2. Amniocentesis.

El procedimiento es similar al de la biopsia corial. La gestante se coloca en posición decúbito supino. Se procede a la exploración ecográfica para identificar el lugar de punción más adecuado (localización placentaria y volumen de líquido amniótico). Asepsia de la zona y anestesia local. Guiada ecográficamente se introduce una aguja espinal de 21 gauge (calibre) y 15 cm de longitud (el trayecto de la aguja se visualiza en todo momento) de manera perpendicular al amnios (Figura 46 A). Una vez en la cavidad amniótica se retira el fiador aspirando el líquido amniótico mediante una jeringa de 20 ml (Figura 46 B, C). Finalmente se retira la aguja con mucho cuidado. El primer mililitro de desecha para reducir la posibilidad de contaminación con células maternas. Se necesitan dos tubos de transporte con 10 ml de líquido amniótico cada uno (Figura 46 D).

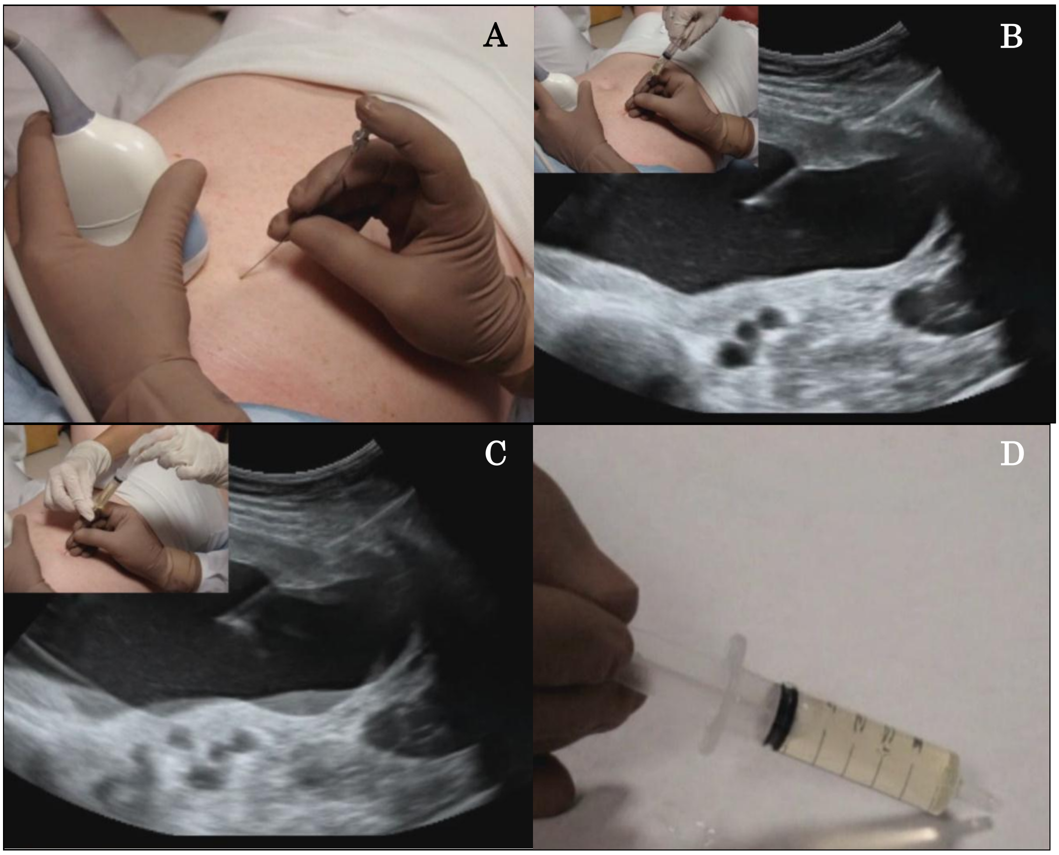


Figura 46. Técnica de Amniocentesis (Fuente: http://www.fetalmedicine.com).

Una vez realizadas ambas técnicas se realiza un control ecográfico para comprobar la ausencia de complicaciones derivadas de la técnica.

Condiciones de recogida de las muestras de líquido amniótico:
➢ esterilidad ➢ extracción 20 ml ➢ rechazo del primer ml por el riesgo de contaminación materna ➢ jeringa y recipiente de transporte no tóxicos y estériles ➢ recipiente de transporte con tapón hermético ➢ tubo —universal" con tapa de rosca facilitados por el laboratorio

Conservación de las muestras:

❖ Si las muestras se envían al laboratorio dentro de las 24 horas siguientes a la extracción, pueden conservarse a temperatura ambiente evitando la exposición a la luz solar.

- Si por el contrario, se envían al laboratorio transcurridas 24 horas de realizar la extracción las muestras deben ser refrigeradas (2-10°C), con cuidado de no congelar. Si se guarda en la nevera se debe poner en el compartimento de la puerta para evitar un enfriamiento excesivo. No se debe retrasar el envío más de 72 horas desde la extracción.

Los tubos de transporte son etiquetados con el nombre de la paciente y su número correspondiente acompañados del informe remitido por el ginecólogo/a y el consentimiento informado.

En ambos casos (muestras de líquido amniótico (LA) y/o vellosidad corial (VC)) se extraen dos tubos, un tubo es para la UGC Laboratorios Clínicos unidad de Biología Molecular para el estudio de los cromosomas mediante la tecnología QF-PCR y el otro para el estudio citogenético convencional del cariotipo. El estudio del cariotipo no se realiza en nuestro hospital, las muestras son enviadas a un laboratorio externo (Echevarne: Laboratorio de análisis clínico en Barcelona).

3.5. RECEPCIÓN Y REGISTRO DE LAS MUESTRAS EXTRAIDAS EN LA CONSULTA DE DIAGNÓSTICO PRENATAL.

En la unidad de Genética se recepcionan las muestras (vellosidad corial y/o líquido amniótico) obtenidas en la unidad de Diagnóstico prenatal, que vienen acompañas de la solicitud y consentimiento informado correspondiente. Previa comprobación de que las muestras están en correctas condiciones (cantidad y calidad de la muestra), se efectúa el registro de entrada de la petición en el sistema informático OMEGA 3000, incluida la digitalización de la documentación adjunta. Se garantiza la protección de los datos y archivos de acuerdo con la legislación vigente.

- **Identificación del solicitante:** teléfono de contacto y dirección postal completa.
- Para **identificar al paciente:** se emplean etiquetas identificativas con código para identificar al paciente. Solicitamos que siempre que sea posible se nos informe el NUHSA (Número Único de Historia de Salud de Andalucía).

- **Consentimiento informado** del paciente firmando la solicitud de estudio genético molecular.
- **Identificación de la muestra:** Mediante pegatinas con código numérico. Se asigna el mismo número de identificación a la muestra y a la hoja de solicitud en el espacio destinado a tal fin.

Una vez que se han registrado las muestras se procede a su procesamiento.

3.6. EXTRACCIÓN DEL ADN DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS MEDIANTE TÉCNICAS INVASIVAS.

La extracción del ADN de vellosidad corial y líquido amniótico se realiza de acuerdo con el kit comercial Quiagen.

3.6.1. Preparación de las muestras de vellosidad corial para la extracción del ADN.

El ADN genómico se extrajo a partir de 3-5 gr de vellosidad corial (Figura 47), se debe realizar inmediatamente o por el contrario conservar en el frigorífico. Es necesario identificar y separar todas las posibles trazas de tejido materno antes de la extracción.

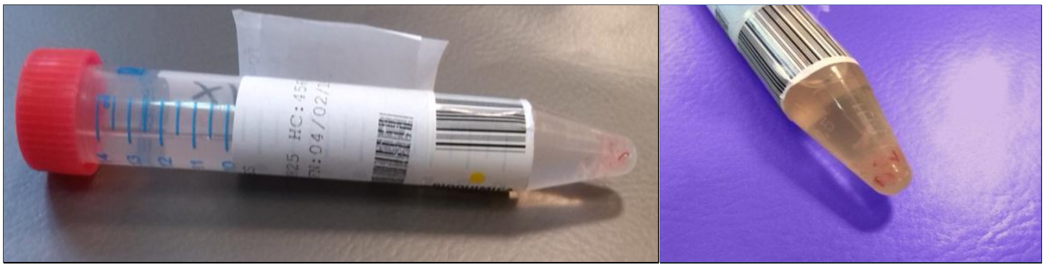


Figura 47. Muestras de vellosidad corial en medio de transporte.

Se llevó a cabo según el siguiente protocolo:

Se coge una pequeña cantidad de tejido con una pipeta Pasteur y se traspasa a un tubo eppendorf de 2.5 ml (el exceso de medio de transporte se aspira con una pipeta Pasteur). A continuación, se añade buffer ATL 180 µl + 20 µl de protein kinasa K y se mezcla con suavidad. El tubo se rodea con parafina para que quede sellado. Finalmente

se incuba al baño maría, este proceso se realiza para homogeneizar el tejido en presencia de la solución de lisis anterior a una temperatura de 55ºC, mínimo dos horas con un máximo de toda la noche.

3.6.2. Preparación de las muestras de líquido amniótico para la extracción del ADN.

El ADN genómico se extrajo a partir de 6 a 7 ml de una muestra de líquido amniótico (Figura 48 A).

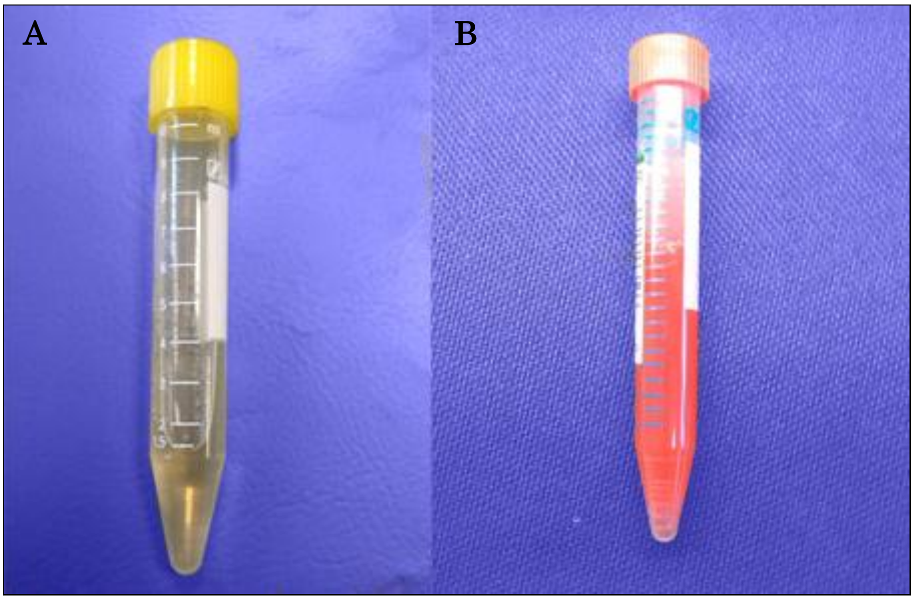


Figura 48. A) Muestra de líquido amniótico preparada para su procesamiento. **B)** Muestra muy hemática de líquido amniótico.

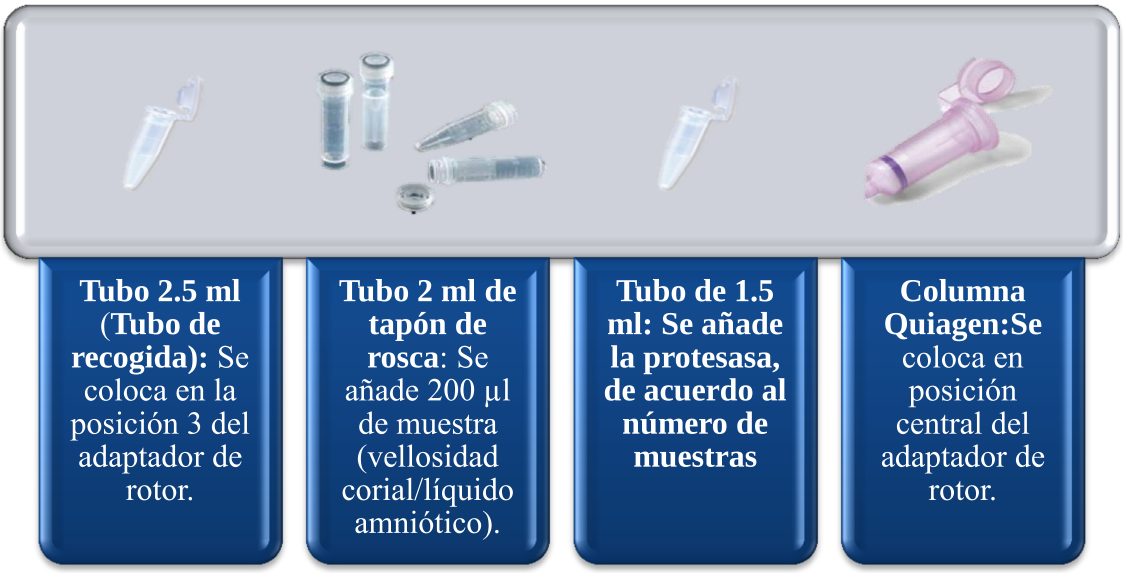
Se llevó a cabo según el siguiente protocolo:

Se centrifuga el líquido amniótico a 2000 rpm durante 15 minutos. Se descarta el sobrenadante y al pellet celular se diluye con 200 µl de PBS 1x. Se mezcla todo correctamente por pipeteo.

3.6.3. Extracción del ADN de las muestras de vellosidad corial y líquido amniótico.

Para realizar la extracción de ADN de las muestras de vellosidad corial y/o líquido amniótico se ha utilizado un extractor automático de ADN –QUIAcube” de Izasa, es un método rápido y de resultados inmediatos completamente automatizado. Una vez preparadas las muestras se procede a la extracción del ADN genómico según el protocolo del extractor automático.

De acuerdo con el protocolo existen 4 clases de tubos que deben ser perfectamente numerados: un tubo de 2.5 ml, un tubo de 2 ml de tapón de rosca, un tubo de 1.5 ml y una columna de Quiagen.



Los tubos de recogida (2,5 ml) y columnas de centrifugación Qiagen se colocan en las posiciones correctas en cada adaptador de rotor tal como se describe en el protocolo (Figura 49A). La tapa de la columna de centrifugación y la del tubo de recolección se mantienen firmemente en las ranuras en el borde del adaptador de rotor. Para facilidad de uso y alta seguridad del proceso, los adaptadores del rotor sólo encajan en los cubos de centrífuga en una orientación específica (Figura 49B). El tubo con la proteasa se coloca en el QUIAcube en la posición A, la tapa del tubo se introduce en la ranura correspondiente (Figura 50). Se comprueban los niveles de buffer y se rellena si es necesario. Hay que cambiar el agua desionizada y autoclavada cada vez que se

procesen nuevas muestras. Se colocan protectores de salpicaduras de silicona en la parte superior del bastidor agitador para ayudar a prevenir la contaminación cruzada y dos bastidores de puntas en la mesa de trabajo: puntas con filtro de 200µl y de 1000µl.

Figura 49. A) Adaptador de rotor. **B)** Agitador orbital con los cubos de centrífuga donde se colocan los adaptadores de rotor.

Figura 50. Bastidor agitador, buffers y bastidores de puntas.

Se selecciona el protocolo **“dna 200 µl elution”** en la pantalla del aparato y se siguen las instrucciones (Figura 51).

Figura 51. Extractor de ADN –QUIAcube".

La extracción de ADN en el extractor automático sigue los mismos pasos que en el procedimiento manual: lisis, lisado, lavado y eluido. Las muestras se sometieron a lisis en el agitador orbital, que es calentado durante el proceso. Cada lisado se transfiere a una columna de centrifugación en un rotor adaptador. El lisado antes debe ser lavado, para ello primero es transferido a la posición media del rotor adaptador. Los ácidos nucleicos se unen a la membrana de sílice o resina de purificación de la columna de centrifugación Quiagen y se lavan para eliminar los contaminantes. La columna de centrifugación se transfiere a un tubo de recogida para la elución de ácidos nucleicos purificados.

Durante el procesamiento de la muestra la pantalla táctil muestra el estado del protocolo y el tiempo restante.

3.6.4. Valoración de la concentración y pureza del ADN extraido.

Anteriormente a la PCR se comprueba que el ADN extraído es puro y no se encuentra contaminado por proteínas, para eso realizamos la espectrofotometría. Utilizamos un espectrofotómetro UV (Jenway-Genova) (Figura 52). Solo se realiza para muestras de vellosidad corial. En este caso se realiza una dilución ¼ de la muestra (preguntar a estas).

Figura 52. Espectofotómetro Jenway-Genova

Se mide la absorbancia (A) a una longitud de onda de 260 nm (una unidad de absorbancia equivale a 50 ng/µL de ADN de doble hebra). La pureza del ADN se termina midiendo la relación entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm (A_{260}/A_{280}). Debe estar entre los valores 1.7 y 1.9 para que el ADN esté puro. Distintos valores indican contaminación por proteínas.

Protocolo:

1. En la cubeta del espectrofotómetro se pipetean 80µl de agua destilada como blanco.
2. Pulsar el botón de blanco en el espectrofotómetro para ajustar la línea de base.
3. Se lava la cubeta con agua destilada y se seca con nitrógeno
4. A continuación, en la cubeta se añaden 60 µl de agua destilada + 20 µl de ADN (1:4) de la muestra de vellosidad corial. Se mezcla el contenido vigorosamente y se da un pulso de centrífuga. Se mide la absorbancia.
5. Finalmente se calcula la cantidad de ADN.

(A260) unidad de dsADN=50 µg /ml

[ADN]µg/ml= (OD 260) x Factor de Dilución x 50 µg de ADN/ml/1 Unidad OD 260

3.7. AMPLIFICACIÓN DEL ADN: Reacción en cadena de la polimerasa

Para la amplificación del DNA se llevó a cabo la técnica Reacción en cadena de la polimerasa descrita por el Doctor Kary Mullisen (1983). Esta técnica amplifica los marcadores STRs mediante la utilización de primers marcados fluorescentemente. Consta de tres fases que se desarrollan a lo largo de una serie de ciclos repetitivos, donde primero hay una desnaturalización del ADN molde, seguido de la hibridación de los primers fluorescentemente marcados y finalmente la extensión mediante la acción de la enzima taq polimerasa.

La amplificación del ADN se llevó a cabo siguiendo la metodología del kit comercial ―Devyser compact" de Applied Biosystems, producto de diagnóstico in vitro para la detección de aneuploidías de los cromosomas 21, 18, 13, X e Y. Se han seleccionado un total de 22 marcadores: 6 STRs para el cromosoma 21; 5 para el cromosoma 13; 4 para el cromosoma 18 y 4 para los cromosomas X e Y. Además, la secuencia no polimórfica del gen amelogenina (AMEL) y la secuencia SRY también fueron incluidas para detectar el sexo del feto. Para facilitar la identificación de monosomias X, en nuestro laboratorio hemos incluido el marcador 7X que permite hacer una cuantificación relativa de los cromosomas 7 y X. La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador Gene Amp PCR Systems 2400 (Applied Biosystems) (Figura 53).

Figura 53. Termociclador Gene Amp PCR Systems 2400

3.7.1. Preparación de la muestra de reacción (Master Mix).

Reactivos:

- PCR ACTIVADOR II
- DEVYSER COMPACT MIX

Protocolo:

Se empieza realizando un pulso de centrífuga a cada uno de los tubos para recolectar el contenido en el fondo de los mismos. En condiciones estrictamente estériles, se añaden 1000 µl de Devyser compact mix al tubo del PCR activador II. Se mezcla pipeteando varias veces hasta el fondo de cada tubo. Se agita con vortex la mezcla de reacción y se centrifuga brevemente. A continuación, se añade a cada tubo de PCR, 20 µl de la mezcla de reacción Máster mix. Finalmente se tapan los tubos de PCR y se centrifugan nuevamente (pueden ser almacenados entre +2º y +8ºC al menos 7 días y por debajo de -18º C al menos 30 días).

3.7.2. Preparación de las muestras y amplificación mediante PCR

Para la realización de la PCR se realizó la siguiente mezcla con un volumen final de reacción de PCR de 25 µl.

Protocolo:

En condiciones estériles se añaden 5 µl de la muestra de DNA (antes hay que diluir el ADN a 10 ng/µl) a un tubo de reacción de PCR (máster mix) de 20 µl. Finalmente se tapan los tubos y se centrifugan brevemente.

El termociclador debe ser encendido 30 minutos antes de comenzar con la amplificación. Se selecciona un volumen de reacción de 25 µl. Se desnaturaliza la mezcla a 95ºC durante 15 minutos, seguidamente se inicia la PCR programando 27 ciclos de PCR de 30 segundos a 94ºC, 90 segundos a 58ºC, 90 segundos a 72ºC con una extensión final de 30 minutos a 72ºC. Una vez finalizados los ciclos se mantiene a 4ºC. La duración aproximada es de 2 horas y 45 minutos (Figura 54).

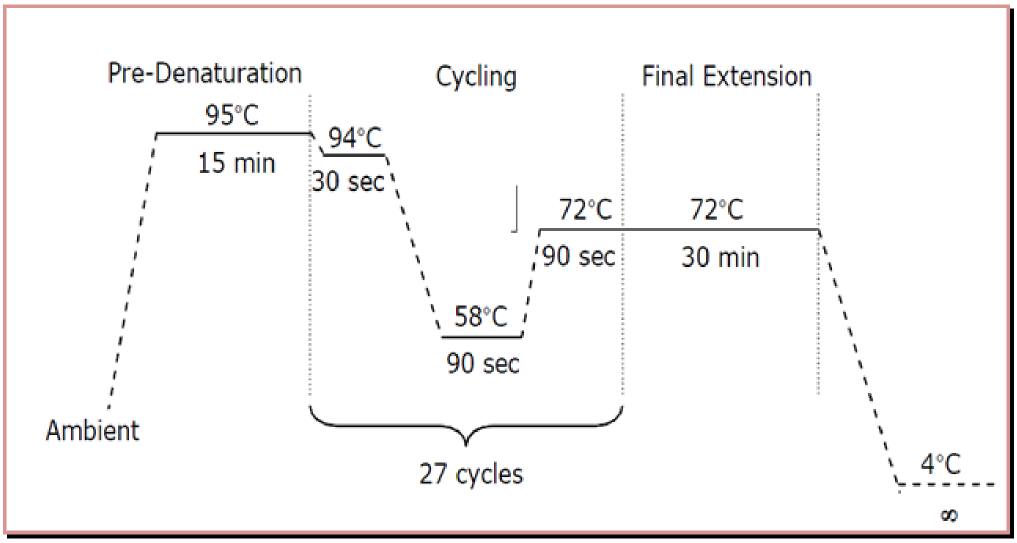


Figura 54. Perfil térmico para la amplificación del ADN de las muestras.

Una vez finalizada la amplificación se recogen los tubos del termociclador y se vuelven a centrifugar brevemente. Se retiran los tapones para evitar posibles contaminantes por el efecto del aerosol.

3.7.3. Preparación de las muestras para la detección de los STRs en el analizador genético ABI PRISM 310.

Una vez finalizado el proceso de amplificación mediante PCR se prepara el cocktail de carga en un tubo, añadiendo 15 µl de Formamida (Hi-Di® Formamida), que actúa como agente desnaturalizante de DNA + 0.5 µl de Gene-Scan-500 LIZ (Applied Biosystem). Se agita con Vortex durante 15 segundos. Se dispensan 15.5 µl a cada tubo individual que van a ser introducidos en el analizador Genético. A continuación, se añade 1.5 µl de producto de PCR (muestra de vellosidad corial diluida al 1/4) al tubo que contiene el cocktail de carga y finalmente se sellan los tubos.

Posteriormente se desnaturaliza la muestra a 95ºC durante 5 minutos en el termociclador (Tabla 8), seguido de una incubación en hielo durante 3 minutos. Finalmente las muestras se introducen en el analizador genético.

Tabla 8. Programa de desnaturalización

User	Desnat
Method	Desnaturalizar
95ºC	5 minutos

3.8. DETECCIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN.

La detección de los productos amplificados fue llevada a cabo por el Analizador Genético ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer de Applied Biosystems mediante electroforesis capilar (Figura 55).

Figura 55. Analizador genético ABI PRISM® 310

Reactivos para la detección de los fragmentos:

- Agua desionizada estéril.
- Formamida desionizada (Hi Di™ Applied Biosystems).
- Marcador de peso molecular (GeneScan®-120 [LIZ]™ GS 500 LIZ® de Applied Biosystems Applied Biosystems).
- Buffer con EDTA (ABI PRISM® 310 10X).
- POP-4™ (Performance Optimized Polymer 4, Applied Biosystems).
- Capilar de sílice (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer Capillary de 47 cm de longitud, 50µm de diámetro).
- Jeringa 1 mL.
- Dos viales de 4 mL para el buffer y el agua.
- Gradilla con 48 pocillos.
- Tubos de 0.5 mL (Genetic Analyzer Applied Biosystems).
- Tapones (Applied Biosystems).

La electroforesis capilar se utiliza para separar fragmentos de ADN según su tamaño y carga eléctrica a través de un polímero en un campo eléctrico. Las muestras se separaran por electroforesis a medida que viajan a través de polímero en el capilar.

Dado que el capilar se fija a lo largo de la mayor parte de su longitud a una placa de calor, la temperatura es controlada durante la electroforesis.

Las secuencias cortas en tándem (STRs) son secuencias cortas de ADN repetidas y específicas para cada cromosoma. Estas son amplificadas por PCR. Emplea primers marcados fluorescentemente que permite visualizarlas y cuantificar estos productos de la PCR. La cuantificación se lleva a cabo calculando la relación proporcional Area/Ratio de las áreas de cada uno de los picos respectivos de su STR utilizando el secuenciador. Dependiendo del número de veces que se repitan los tri, tetra or pentra-nucleoótidos los STRs varían en tamaño entre los distintos individuos. Los STRs amplificados con esta técnica permiten determinar el número de copias de esa región cromosómica, por lo tanto, en un individuo heterocigoto normal los dos alelos producen productos de igual fluorescencia.

Los STRs utilizados han sido los del kit Devyser compact para la detección de aneuplodías de los cromosomas 21, 18, 13, X e Y en diagnóstico prenatal. La localización de estos STRs se muestra en las siguientes tablas:

Tabla 9. Marcadores seleccionados para la detección de aneuploidías mediante QF-PCR.

MARCADOR	LOCALIZACIÓN	MARCADOR	HETEROCIGOSIDAD	RANGO MARCADOR	COLOR
13A	13q12.12	D13S742	0.89	232-316	VERDE
13B	13q21.32	D13S634	0.89	365-425	AZUL
13C	13q31.3	D13S628	0.74	425-474	AMARILLO
13D	13q13.3	D13S305	0.80	413-479	VERDE
18B	18q12.3	D18S978	0.77	180-228	AMARILLO
18C	18q12.3	D18S535	0.78	298-350	AZUL
18D	18q22.1	D18S386	0.94	322-403	VERDE
18M	18p11.32	GATA178F11	0.81	346-405	AMARILLO
18J	18p11.31	D18S976	0.75	430-487	ROJO
21A	21q21.3	D21S1435	0.76	150-207	AZUL
21B	21q21.1	D21S11	0.82	220-285	AZUL
21C	21q22.3	D21S1411	0.89	246-340	AMARILLO
21D	21q22.13	D21S1444	0.81	440-492	AZUL
21H	21q21.3	D21S1442	0.80	360-415	ROJO
21I	21q21.1	D21S1437	0.81	105-150	AMARILLO

Tabla 10. Marcadores seleccionados para la detección de aneuploidías mediante QF-PCR.

MARCADOR	LOCALIZACIÓN	MARCADOR	HETEROCIGOSIDAD	RANGO MARCADOR	COLOR
XY1	Xp22.22 Yp11.2	AMEL	-	X=106 Y=112	VERDE
XY2	Xp21.3 Yp11.31	DXYS267	0.82	182-222	VERDE
X1	Xq26.2	DXS1187	0.74	120-170	VERDE
X2	Xq13.1	DXS981	0.76	230-260	ROJO
X4	Xq21.33	DXS6809	0.78	290-350	ROJO
Y1	Xp11.31	SRY	-	236	AMARILLO
7X	7q34 Xq13	7X	-	7=184 X=204	ROJO

3.8.1. Preparación del ABI PRISM 310.

Una vez preparadas las muestras hay que inyectarlas en el analizador, pero antes de ello es necesario poner a punto el aparato. El equipo está enteramente controlado por ordenador, es importante encender primero el ordenador y a continuación el ABI PRISM 310. Se siguieron los siguientes pasos:

- El primer paso es establecer la comunicación entre el ABI 310 y el ordenador. El ABI 310 utiliza como software de recogida de datos el 310 Data Collection. La técnica utilizada es el marcaje del ADN con múltiples fluorocromos. Este software recoge y analiza los datos en bruto (crudo) de la secuenciación de los fragmentos del ADN. El dato bruto es la fluorescencia de los fragmentos de ADN marcados que detecta la cámara CCD, separados en el capilar por electroforesis y excitada por el láser cuando pasa por la ventana de detección. El programa automatiza el tamaño de fragmentos de ADN. También proporciona flexibilidad para confirmar interactivamente y afinar el análisis de datos.

A través del Data Collection el ABI reconoce la posición del autosampler y de la jeringa de inyección.

- Se coloca el bloque de metacrilato limpio y seco en el automuestreador. A continuación se coloca el capilar; para su correcta colocación es necesario limpiar

anteriormente la ventana del capilar con papel humedecido en etanol absoluto. Hay que abrir la puerta que cubre la placa de calor. Se introduce el capilar en la válvula que conecta con el bloque de metacrilato hasta llegar a la primera intersección y se cierra bien la válvula. Alinear la marca de lectura del capilar en la placa del detector del láser en posición vertical. A continuación hay que colocar el otro extremo del capilar en el bloque que contiene el cátodo deslizando el capilar hacia abajo quedando justo a la altura de este. El capilar se sujeta a la placa térmica con cinta adhesiva. Por último cerrar la puerta del detector láser para asegurar la posición de la ventana del capilar.

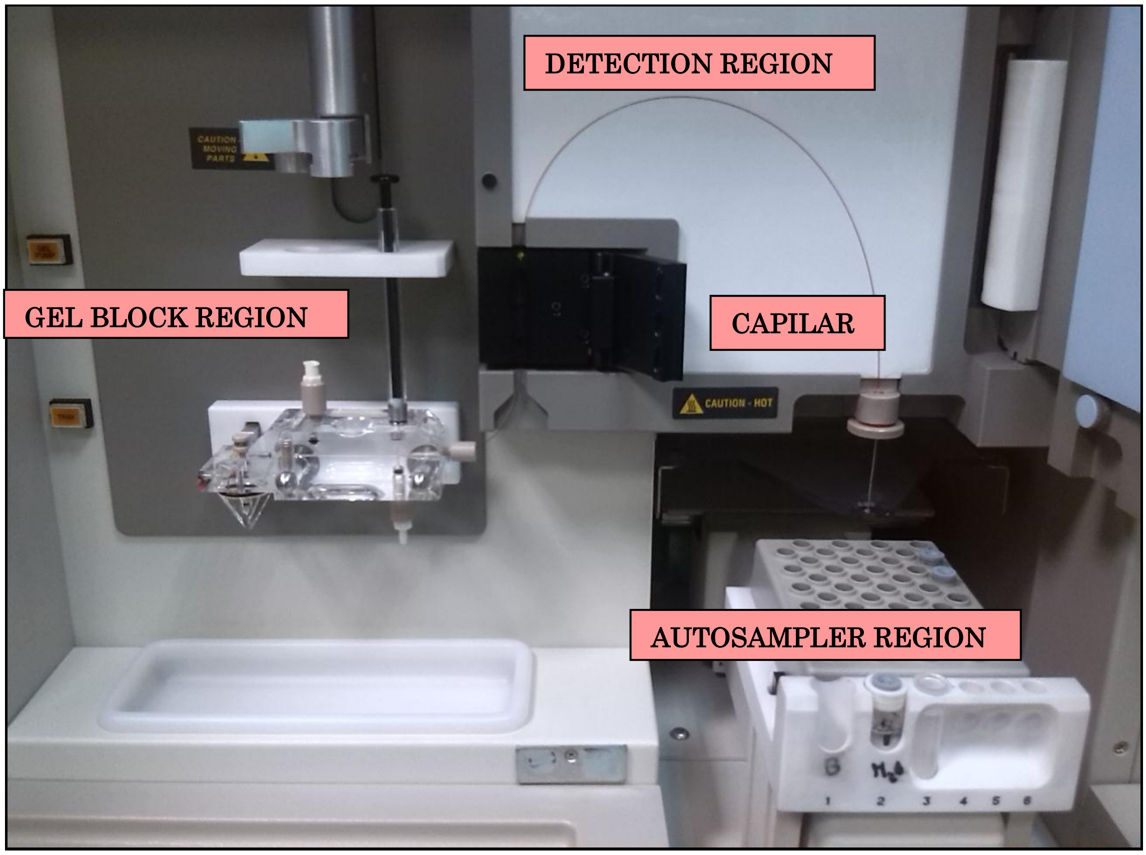


Figura 56. Analizador genético ABI PRISM® 310.

- **Preparación de la jeringa:** Es el depósito del polímero durante la carrera, la jeringa debe estar bien limpia para tal efecto y bien enroscada para que no haya pérdidas de polímero (Figura 57). El polímero utilizado es el POP-4, se pone la cantidad necesaria dependiendo de la cantidad de muestras que vayamos a utilizar.

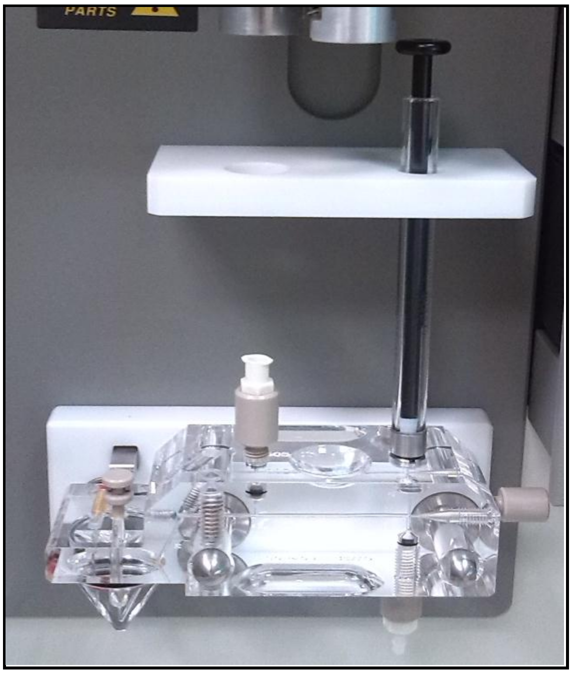


Figura 57. Jeringa del ABI PRISM® 310.

- **Rellenar el capilar y el bloque de metacrilato "seq fill capillary" con el polímero POP-4:** Con la jeringa se procede al llenado del bloque de metacrilato y sus conductos evitando la formación de burbujas de aire con la jeringa.

➢ CALIBRACIÓN DEL ABI PRISM 310:

Hay que establecer a través del software de recopilación de datos la **posición de la jeringa y del autosampler**: Se retira la bandeja de muestras y el tubo Eppendorf del autosampler. Para calibrar el autosampler nos ayudamos de unos puntos negros que existen en la parte delantera y trasera de la plataforma donde va la bandeja de muestras.

Hay que alinear el punto de calibración en la parte frontal de la plataforma de la bandeja con el capilar. El electrodo y el capilar deben estar sumergidos en la muestra durante la inyección electrocinética. El volumen mínimo de la muestra es de 10 µl.

3.8.2. Programación de las muestras.

Una vez preparadas las muestras antes de comenzar la electroforesis capilar se programan las muestras en el software de recogida de datos **310 Data Collection versión 3.1.0**.

- **GeneScan: Sample sheet**

La programación de la muestras se realizó en el software de recogida de datos **Data Collection** (Figura 58).

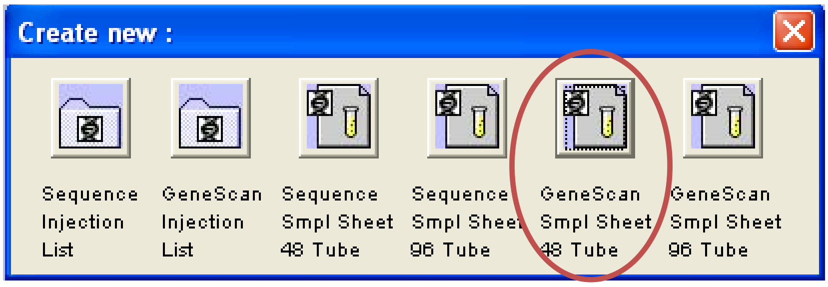


Figura 58. Hoja de muestras.

Hay que indicar que se va a analizar con 5 colores. En la hoja de muestras se pone la información relevante de cada muestra, como es el número de muestra, fecha del análisis y posición que ocupa en la gradilla. En la columna ―std" aparece un rombo que significa el color del estándar de cada muestra. En la hoja de muestras siempre se dejará la posición A1 para el test (Figura 59). La hoja se guarda en su carpeta correspondiente.

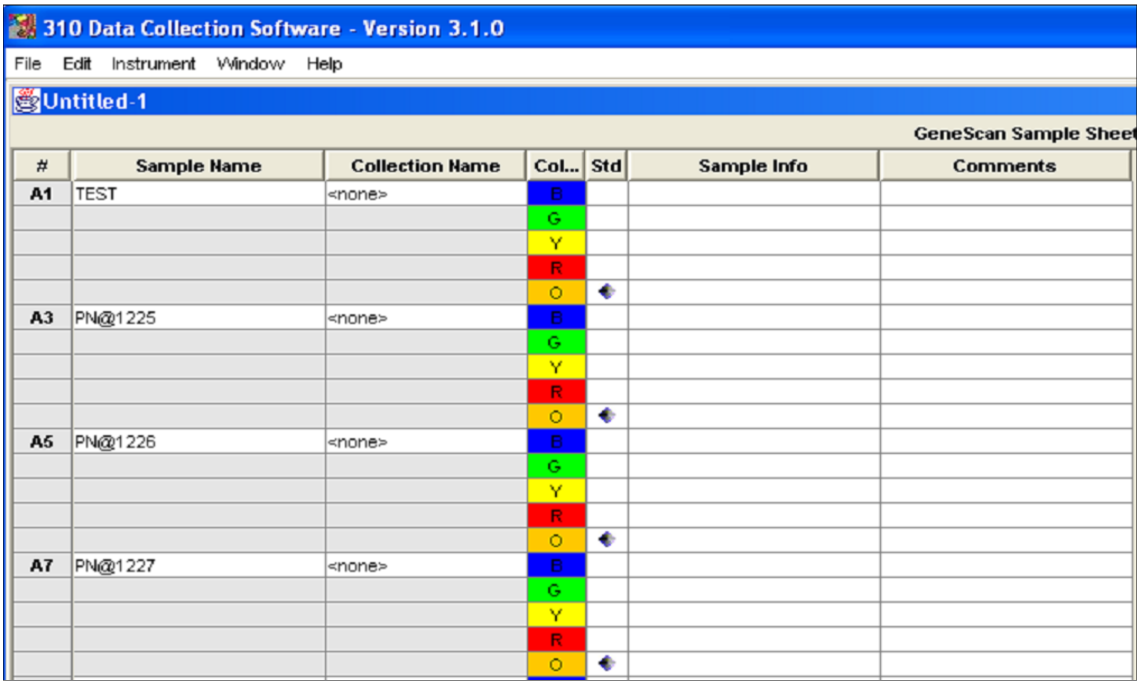


Figura 59. Hoja de muestras

Una vez programadas las muestras, se establecen una serie de parámetros de análisis a través de GeneScan Injection List (Figura 60).

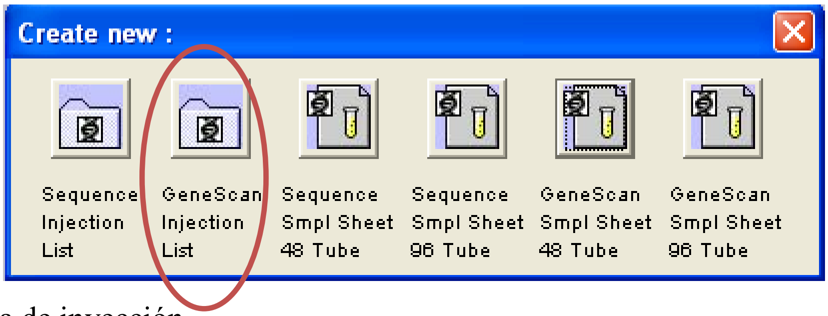


Figura 60. Lista de inyección

3.8.3. Lista de inyección.

A continuación, se realiza la lista de inyección para ello, incorporamos a esta lista la hoja creada anteriormente. La lista de inyección especifica el orden para procesar las muestras, cuántas inyecciones se hacen de cada muestra, el módulo y las condiciones de funcionamiento para cada inyección. El botón Ejecutar en la lista de inyección se utiliza para comenzar la carrera. Cada tubo de muestra se asocia con una posición determinada.

Se pueden hacer una serie de modificaciones, repetir algunas muestras cambiando parámetros como el tiempo de inyección o modificar el orden de inyección de las muestras.

Hay una primera columna que especifica el orden de las muestras en ejecución. Al seleccionar el módulo que se encuentra en la segunda columna los parámetros de ejecución van de acuerdo con el módulo seleccionado (temperatura, voltaje de electroforesis, tiempo de inyección). Estos parámetros pueden ser modificados según las condiciones deseadas de cada uno (Figura 61). El módulo seleccionado es el siguiente:

Tabla 11. Módulo de análisis seleccionado para el procesamiento de las muestras.

Módulo	GS STR POP 4 (1ml) G5v2
Voltaje de inyección	15
Tiempo de inyección	5 segundos
Moltaje de electroforesis	15
Temperatura de electroforesis	60º
Tiempo de electroforesis	40
Matriz	AME 5 Dye

Voltaje y tiempo de inyección: Estos parámetros pueden ser modificados para regular la cantidad de ADN que entra en el capilar. Es posible aumentar el tiempo de inyección si la intensidad de la señal de la muestra es muy débil, con esto se consigue que se inyecte más cantidad de muestra para ser detectada ya que aumenta la señal de fluorescencia.

Voltaje de electroforesis: Se ha utilizado el polímero POP-4 cuyo voltaje estándar es de 319 V/cm. El capilar del ABI 310 tiene una longitud de 47 cm con lo que supone un voltaje total de 15 K y una corriente de 7-9 µA. Dadas estas condiciones de electroforesis un fragmento de 400 pares de bases tarda unos 40 minutos en llegar a la ventana de detección.

Temperatura de electroforesis: La temperatura necesaria para análisis de fragmentos es de 60º.

Tiempo de electroforesis: el tiempo de electroforesis es un 10% mayor a la media del tiempo necesario para que ocurra la migración del fragmento de mayor tamaño.

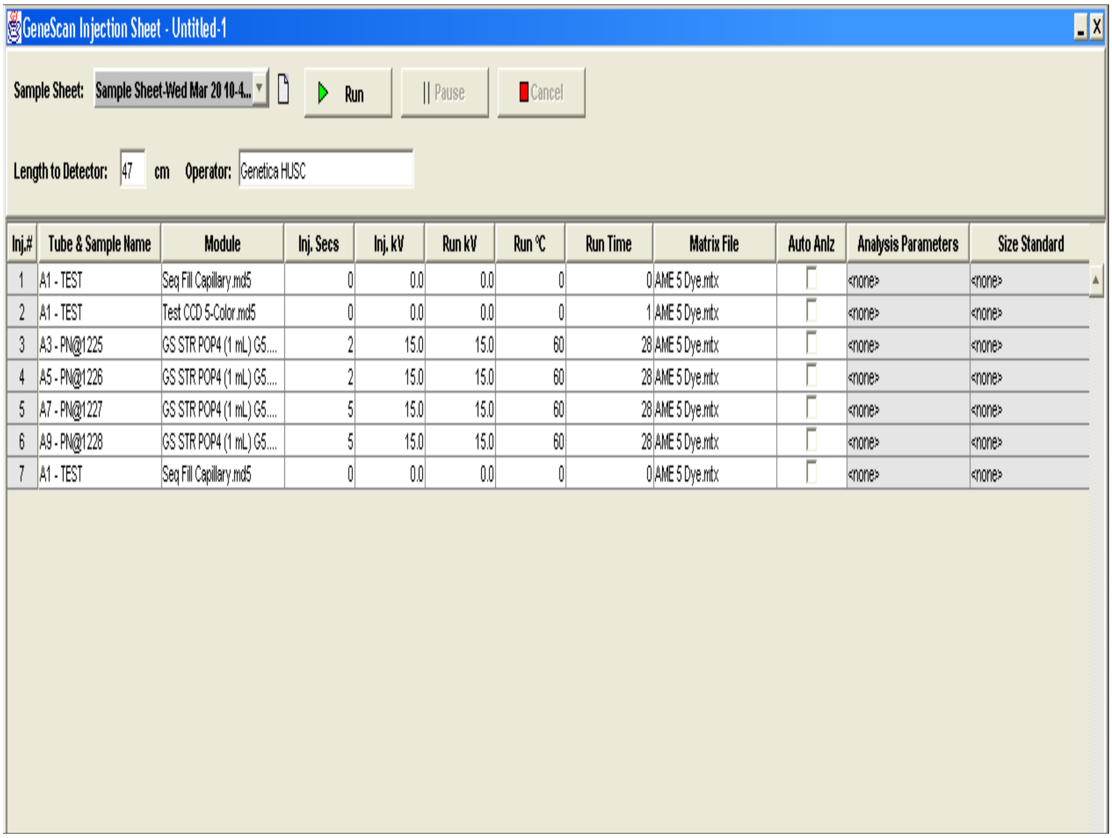


Figura 61. Lista de inyección.

Antes de llevar a cabo el análisis se realiza el test de los cinco colores (test CCD 5-color) (Figura 62), este test comprueba que la ventana del capilar está correctamente colocada y limpia. Tiene una duración de 5 minutos. Hay que comprobar que la línea basal este entre 800 y 2500 en escala vertical.

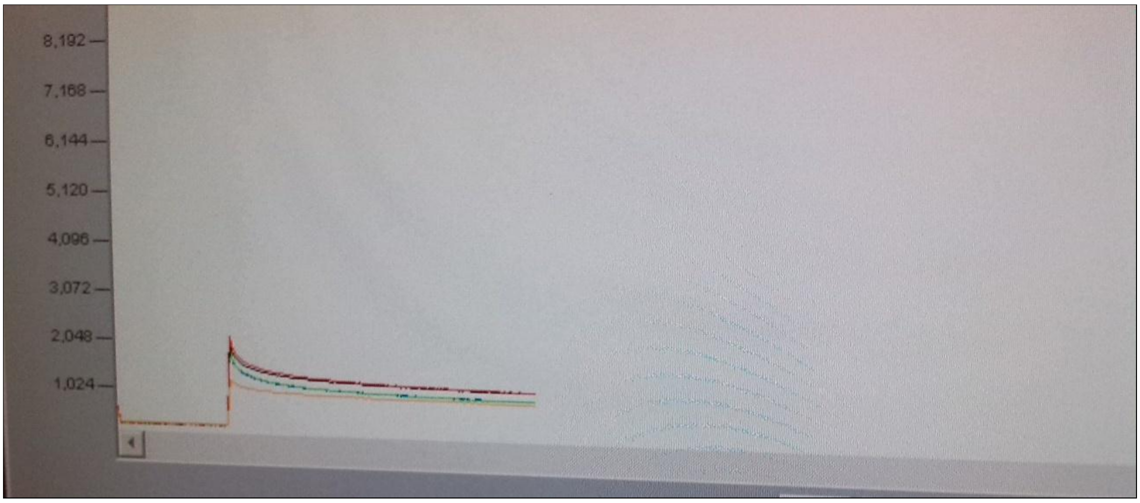


Figura 62. Test de los 5 colores realizado en las muestras prenatales.

Cuando se ha alcanzado la temperatura de electroforesis 60º pulsamos ―**run**” y comienza el análisis electroforético.

3.9. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

El software GeneMarker versión 1.91 es el encargado del análisis de los resultados. Este software determina el tamaño de los fragmentos calculando altura y área de los picos. Identifica los alelos correspondientes a estos picos. Los fragmentos se analizan con el filtro G5 (los filtros se utilizan para separar las distintas longitudes de onda) y la matriz AME 5 Dye. La matriz matemática es la encargada de corregir el solapamiento entre las longitudes de onda emitidas por los 5 fluorocromos.

El empleo de ―primers” marcados fluorescentemente nos permite visualizar y cuantificar los productos de la PCR. La cuantificación se lleva a cabo calculando la relación proporcional área/ratio de las áreas de cada uno de los picos respectivos de su STR utilizando un secuenciador automático de ADN. Como los STRs varían en tamaño entre individuos, dependiendo del número de veces que se repiten los tri-, tetra- o penta-

nucleótidos, el DNA amplificado de individuos normales que son heterocigotos para un marcador STR mostrará dos picos diferentes (tienen alelos de diferente longitud) con un área similar.

El rango de altura aceptable para los picos de cada marcador se sitúa entre 50 y 6000 unidades relativas de fluorescencia (RFU).

En el análisis llevado a cabo para que un resultado sea **NORMAL** al menos dos marcadores de un genotipo dialélico, para cada uno de los cromosomas analizados debe ser informativo.

Para un resultado **ANORMAL** debe haber al menos dos marcadores que sean informativos de un genotipo trialélico, para alguno de los cromosomas analizados.

- **Patrón alélico normal se determina por:**

Aparecen dos picos para un determinado marcador y estos tienen una altura/área similar siendo así el Área Ratio1:1 (marcador heterocigoto) (Figura 63).

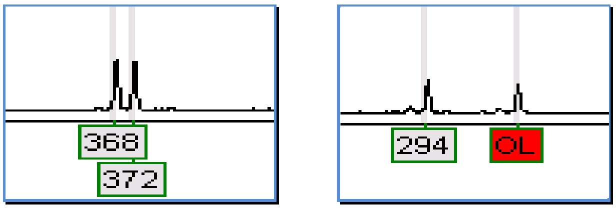


Figura 63. Marcador dialélico (área ratio 1:1)

- **Patrón alélico anormal se determina por:**

a) Aparecen tres picos para un determinado marcador y estos tienen una altura/área similar siendo así el Área Ratio 1:1:1 (Figura 64).

b) Aparecen dos picos para un determinado marcador y estos tienen una altura/área diferente siendo así el Área Ratio 2:1 ó 1:2 (Figura 65).

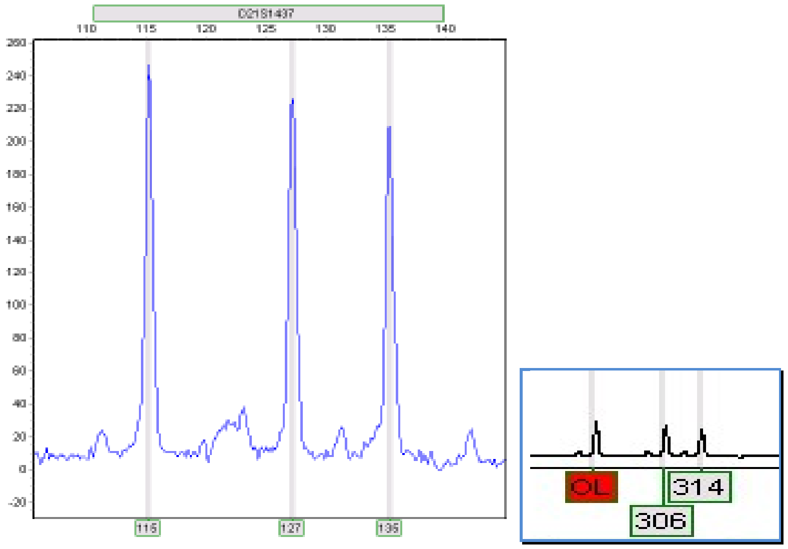


Figura 64. Marcador trialélico de trisomía (área ratio 1:1:1)

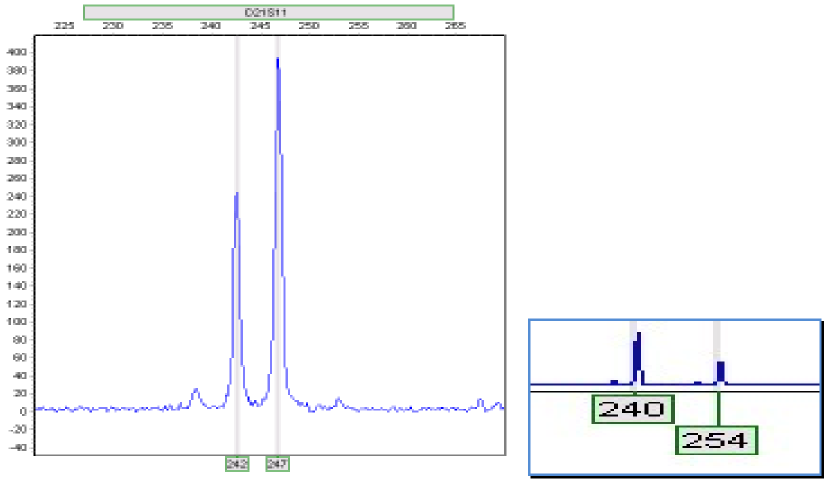


Figura 65. Marcador dialélico de trisomía (área ratio 2:1; área ratio 1:2)

➢ Marcador Homocigoto/monosómico.

Los individuos que son homocigotos (tienen alelos del mismo tamaño) o monosómicos mostrarán un único pico. Un perfil monosómico para cromosoma X se determina siempre y cuando ocurra que:

a) Todos los marcadores X y XY muestran un perfil homocigoto.

b) No aparecen el Pico 2 del marcador XY1 y el pico Y1.

c) El marcador 7X muestra dos picos con una relación altura/ área diferente y además el Área Ratio es de 2:1.

La incapacidad del análisis de STR para distinguir sujetos que son homocigotos o monosómicos es el principal problema cuando se quieren descubrir anormalidades en los cromosomas sexuales. Aun cuando se utilizan STRs específicos para el cromosoma X, algunas muestras de hembras XX normales pueden mostrar perfiles homocigotos de QF-PCR, indiferenciables de aquellos producidos con un único cromosoma X, como en el síndrome de Turner. La incorporación en el análisis de marcadores STR adicionales del cromosoma X reducirá pero no eliminará la posibilidad de confusión en una homocigosis.

Para la identificación de monosomías X se utiliza el marcador 7X que permite hacer una cuantificación relativa de los cromosomas 7 y X. En una hembra normal el ratio esperado 7X es 1:1 (Figura 66A). En varones normales y hembras con monosomía X se muestra un ratio 2:1 (Figura 66B).

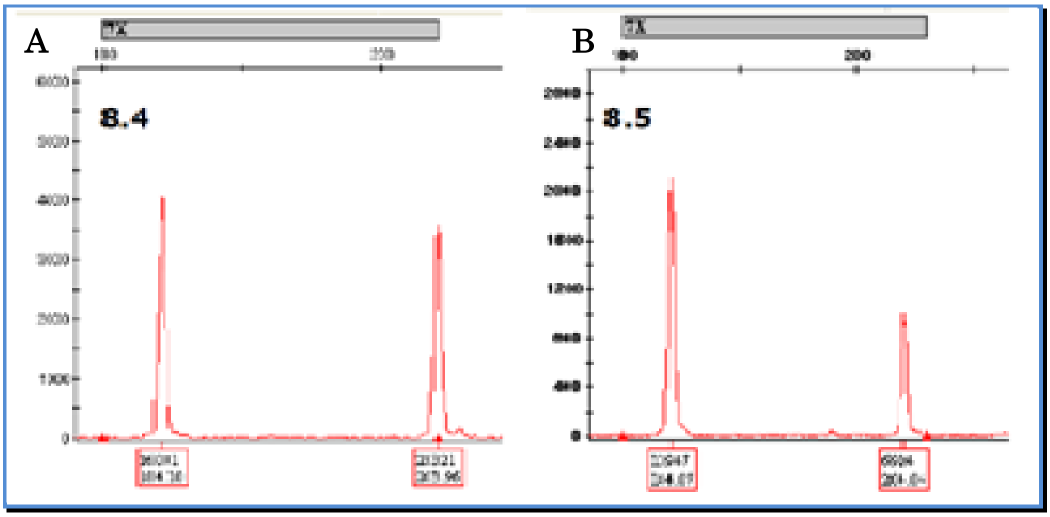
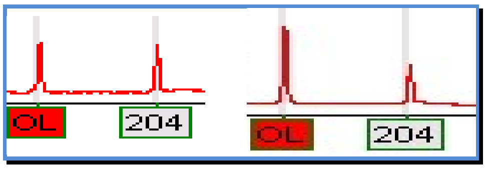


Figura 66. A) Hembra normal con un área ratio 1:1 **B)** Varón normal con un ratio 2:1



Ratio Criteria (RC)

RC1: Se utiliza cuando la distancia entre los dos picos de aquel marcador es mejor de 24 pb.

RC 2: Lo empleamos cuando esa distancia es mayor de 24 pb.

Tabla 12. Marcadores dialélicos

Relación	1:2	No concluyente	1:1	No Concluyente	2:1
RC 1	<0.65	0.65-0.74	0.75-1.44	1.45-1.80	>1.80
RC 2	<0.65	0.65-0.74	0.75-1.44	1.55-1.80	>1.80

Tabla 13. Marcadores trialélicos

Relación	No concluyente	1:1:1	No concluyente
RC 1	<0.74	0.75-1.44	>1.45
RC 2	<0.74	0.75-1.54	>1.55

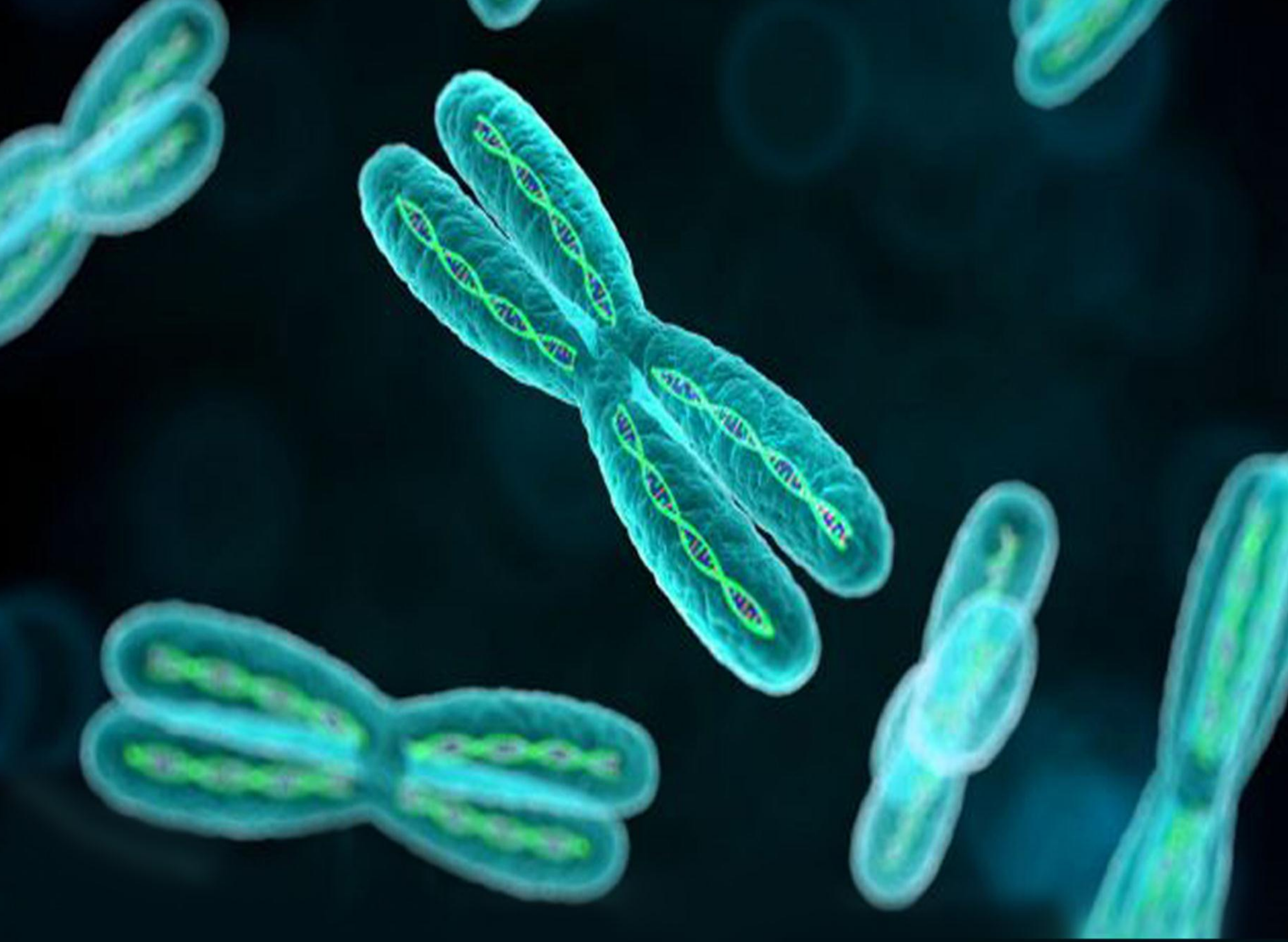
3.10. ANÁLISIS DE LOS CROMOSOMAS MEDIANTE LA QF-PCR Y CARIOTIPO CONVENCIONAL.

La realización de técnicas invasivas se ha realizado en 262 pacientes de 4629 que se sometieron al “test combinado del primer trimestre” en el periodo de Mayo de 2009 hasta Abril de 2011. Hemos aumentado el número de muestras a analizar hasta diciembre de 2012 para hacer un estudio más completo y poder comparar los resultados de la QF-PCR con el cariotipo, por lo tanto, se han analizado los cromosomas de un total de 928 muestras de mujeres embarazadas que se han realizado una prueba invasiva (biopsia corial y/o amniocentesis) mediante técnicas citogenéticas. Todas las muestras se analizaron tanto por QF-PCR como por cariotipo completo, para realizar la comparación de los resultados.

Las anomalías cromosómicas detectadas mediante cariotipo, se clasifican como normal o anormal. El grupo anormal incluye cariotipos con un riesgo elevado o incierto de resultado clínicamente adverso (trisomías 21, 18, 13, monosomía X, otras aneuploidías de los cromosomas sexuales, triploidías, tetraploidías, otras trisomías,

deleciones o duplicaciones, reordenamientos balanceados de novo, y reordenamientos no balanceados y trisomías en mosaico) mientras que el grupo normal incluye cariotipos sin riesgo o bajo riesgo de resultado clínicamente adverso (translocación equilibrada y reordenamientos de novo sin pérdida de material genético). A continuación, se clasificaron los casos anormales en función de si se detectaron mediante QF-PCR o no.

Tras obtener los resultados del cariotipo, se analizó el grupo de pacientes que presentaron anomalías cromosómicas clínicamente significativas para determinar que medida ecográfica de TN y que anomalías ecográficas serían las más indicadas para realizar el cariotipo completo además de la QF-PCR. Hemos calculado cómo aumentaría la tasa de detección de esas anomalías realizando cariotipo completo en ese porcentaje de casos, la reducción de costes económicos y que casos no serían detectados con esta política restrictiva versus la actual de realizar ambas pruebas en todas las pacientes.



4.RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN CRIBADA (Periodo de Mayo de 2009 hasta abril de 2011).

Se han estudiado un total de 4629 pacientes con gestación simple en el primer trimestre de embarazo (semanas 11-13^{+}6). Dentro de este grupo se identificaron 214 (4.6%) pacientes con un cribado de alto riesgo de anomalías cromosómicas y 4415 (95.4%) pacientes con un bajo riesgo (Figura 67). De las 214 pacientes que presentaron un riesgo elevado, a 181 (84.6%) se les realizó la prueba invasiva y a 33 (15.4%) no se le realizó ninguna prueba invasiva durante la gestación. De las 4415 pacientes que presentaron un bajo riesgo de anomalías cromosómicas, 81 (1.8%) se sometieron a una prueba invasiva por decisión propia. En total son 262 (5.7%) pacientes a las que se les realizó una prueba invasiva diagnóstica para el estudio de cromosomopatías (Figura 68).

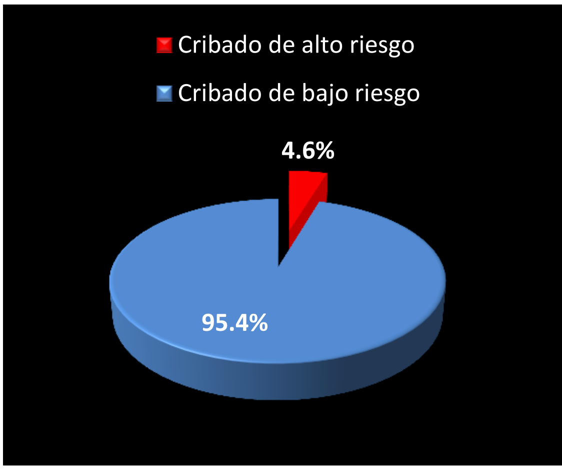


Figura 67. Población cribada n=4629

Figura 68. Pacientes sometidas a una prueba diagnóstica invasiva.

La edad materna promedio de las pacientes objeto de nuestro estudio, fue de 37 años (rango, 15-49). La edad gestacional media en el momento de la ecografía para la valoración de los marcadores ecográficos fue de 12 semanas (Figura 69). Las características de la población se resumen en la tabla 14.

Tabla 14. Características de la población de estudio (n=4629)

Características Maternas	
Edad en años (mediana (rango))	**37 (15-49)**
Peso en Kg* (mediana (rango))	**62 (44-109)**
Origen étnico* (n (%)):	
➢ **Asia (India, Pakistán, Bangladesh)**	**3 (0.1%)**
➢ **Negro (África, Caribe, afro-americano)**	**34 (0.7%)**
➢ **Asia Oriental (chino, coreano y japonés)**	**14 (0.3%)**
➢ **Blanco (Europa, Oriente Medio, Norte de África, hispanos)**	**4565 (98.6%)**
Modo de concepción* (n (%)):	
➢ **In vitro**	**77 (1.7%)**
➢ **Espontaneo**	**3297 (71.2%)**
➢ **No se conoce**	**1255 (27.1%)**
Características Ecográficas	
Longitud cráneo-caudal (mm, mediana (rango))	**62.05 (42-94.20)**
TN(mm, mediana (rango))	**1.803 (0.9-9.0)**
Semana Gestacional (mediana (rango)) (Figura 69)	**12.09 (10-14)**

*Variables incorporadas en el algoritmo para el cálculo de riesgo.

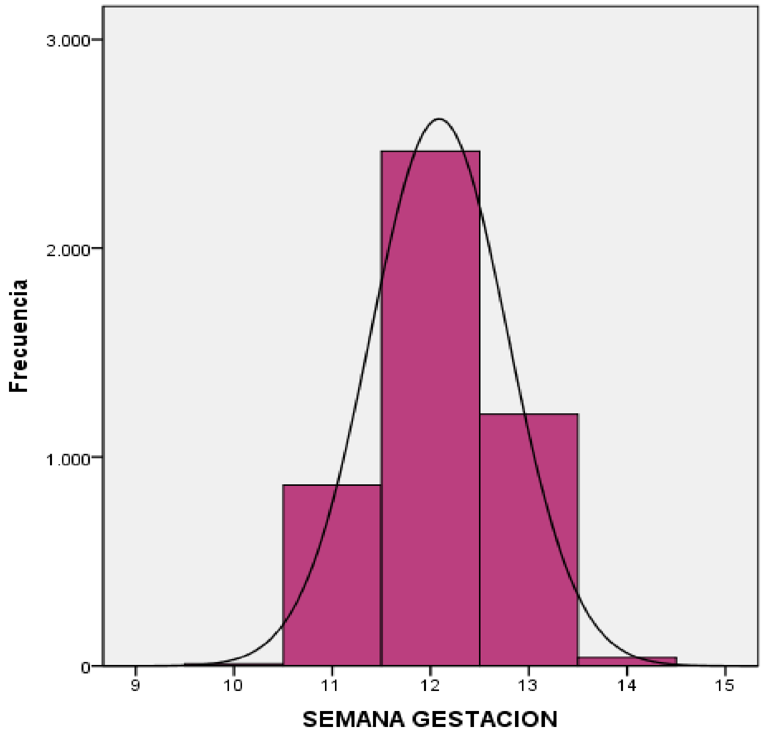


Figura 69. Distribución de la edad gestacional en el cribado del primer trimestre.

4.1.1. Población aneuploide.

Del total de 4629 pacientes cribadas, se han identificado 4572 (98.8%) embarazos euploides y 57 (1.2%) casos de anomalías cromosómicas (Figura 70). Las anomalías cromosómicas encontradas corresponden a: 37 (65%) casos de trisomía 21; 5 (8.8%) casos de trisomía 18; 6 (10.5%) casos de trisomía 13 y 2 (3.6%) casos de síndrome de Turner, el 12.1% restante corresponde a: 1 (1.7%) trisomía 9; 4 (7%) casos de translocaciones equilibradas; 1 (1.7%) cromosoma Y satelitar y 1 (1.7%) inversión del cromosoma 9 (Figura 70).

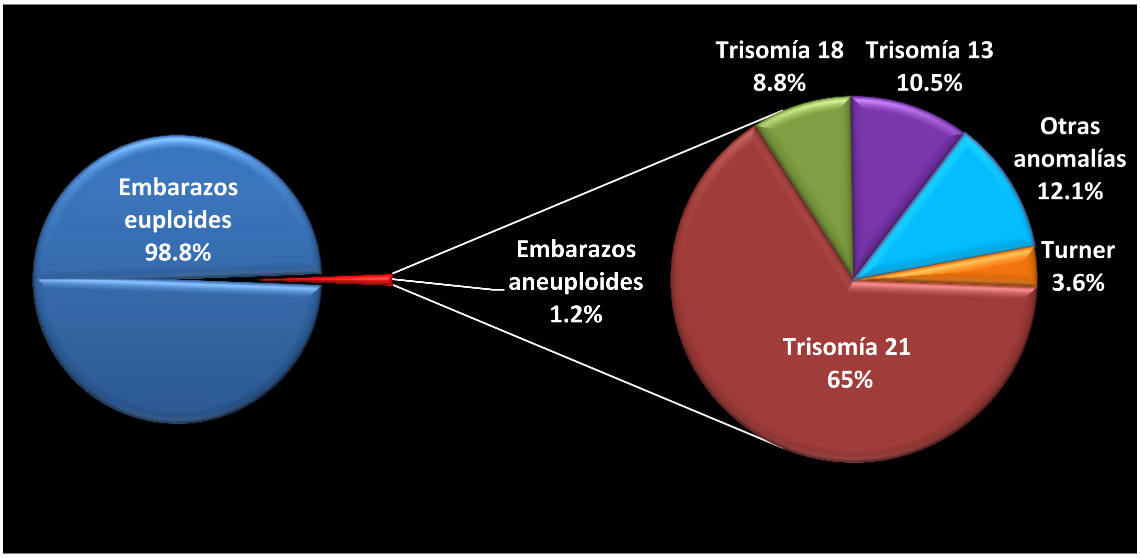


Figura 70. Anomalías cromosómicas en la población estudiada (N=4629).

4.2. EFICACIA DE LA TÉCNICA DE CRIBADO COMBINADO EN EL PRIMER TRIMESTRE.

El cribado combinado del primer trimestre basado en la edad materna, TN, marcadores ecográficos secundarios (HN, DV y RT) y marcadores bioquímicos (PAPP-A y B-hCG) presentó una tasa de detección para la trisomía 21 y otras anomalías cromosómicas del 96% con una tasa de falsos positivos del 3.7%. En la Tabla 15 se resumen la especificidad y los valores predictivos positivos y negativos.

Tabla 15. Capacidad técnica del método de cribado.

Tasa de detección	96%
Tasa de fasos positivos	3.7%
Especificidad	96%
Valor predictivo positivo	21%
Valor predictivo negativo	100%

La utilización de este método de cribado ha permitido la detección de 36/37 (97.3%) casos de trisomía 21; 3/5 (60%) casos de trisomía 18 y 4/6 (66.7%) casos de trisomía 13, cuando se establece como punto de corte el valor de 1/270. Se identificó también un caso de síndrome de Turner (1/2, 50%), que aunque el cribado no es específico para esta aneuploidía, la identificación de hallazgos ecográficos anormales hizo sospechar de esta anomalía. Si para la estimación del riesgo de la trisomía 18 se establece como punto de corte 1/100 permitirá la detección de 4/5 (80%) fetos afectos de trisomía 18. En el caso de la trisomía 13 si se establece como punto de corte 1/100 se detectará el 100% de los fetos afectos de trisomía 13 (Tabla 16).

Tabla 16. Número de anomalías cromosómicas encontradas en nuestro estudio y tasa de detección de aneuploidías basadas en el cribado combinado del primer trimestre.

Anomalías Cromosómicas	N	Anomalías que presentan un riesgo≥270		TD de la trisomía 18 con riesgo 1:100		TD de la trisomía 13 con riesgo 1:100	
Trisomía 21	37	36	97.30%	-	-	-	-
Trisomía 18	5	3	60%	4	80%	-	
Trisomía 13	6	4	66.70%	-	-	6	100%
Síndrome de Turner	2	1	50%	-	-	-	-
Total	50	43	86%	4	-	6	-
		169	3.70%				

TD: Tasa de detección

En el presente estudio se encontraron dos casos de falsos negativos: El primer caso fue una trisomía 21 no diagnosticada a lo largo del curso del embarazo, debido a que presentó un cribado combinado de bajo riesgo (1/2814), ya que los marcadores ecográficos (translucencia nucal y marcadores ecográficos secundarios) y bioquímicos (fβ-hCG libre y PAPP-A) presentaron valores normales. Como consecuencia, el

resultado postnatal fue de una niña con Síndrome de Down. El segundo caso fue una trisomía 18, con cribado combinado de bajo riesgo, por presentar los marcadores específicos de anomalías cromosómicas normales. En la exploración ecográfica se observó la presencia de manos en garra característica de este síndrome, por ello la madre decidió realizarse la prueba invasiva. El resultado fue un aborto espontaneo.

4.3. COMPORTAMIENTO DE LA TRANSLUCENCIA NUCAL EN FETOS EUPLOIDES Y ANEUPLOIDES.

La mediana de la translucencia nucal de la población cribada (n=4629) fue de 1.8 mm (rango 0.9-9.0) con una desviación típica de 0.49. La distribución de los valores de la TN se muestra en la figura 71. En la figura 72 y 73 se muestran los valores de la TN en fetos euploides y aneuploides respectivamente.

.

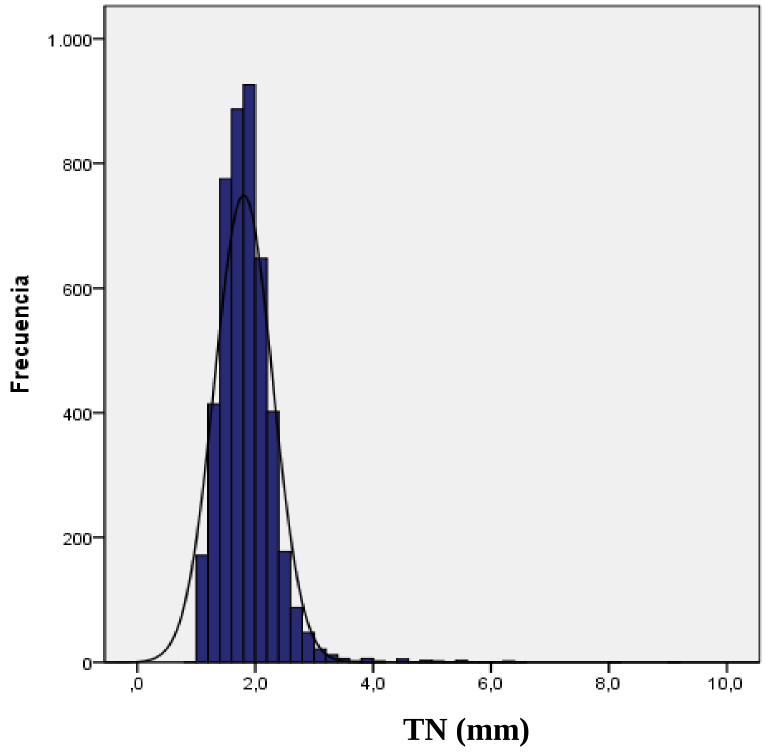


Figura 71. Distribución de la TN en la población cribada.

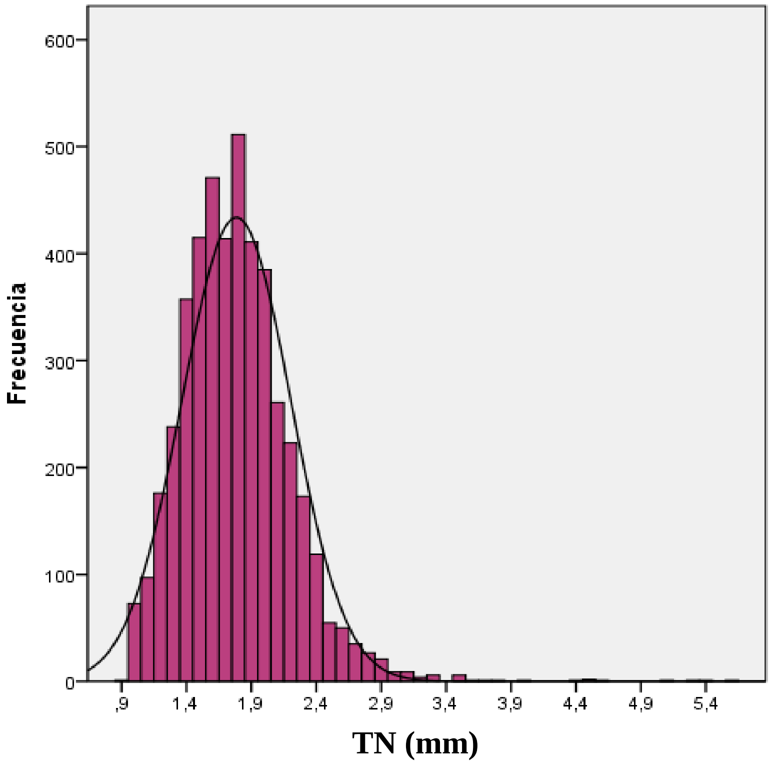


Figura 72. Distribución de la TN en fetos euploides.

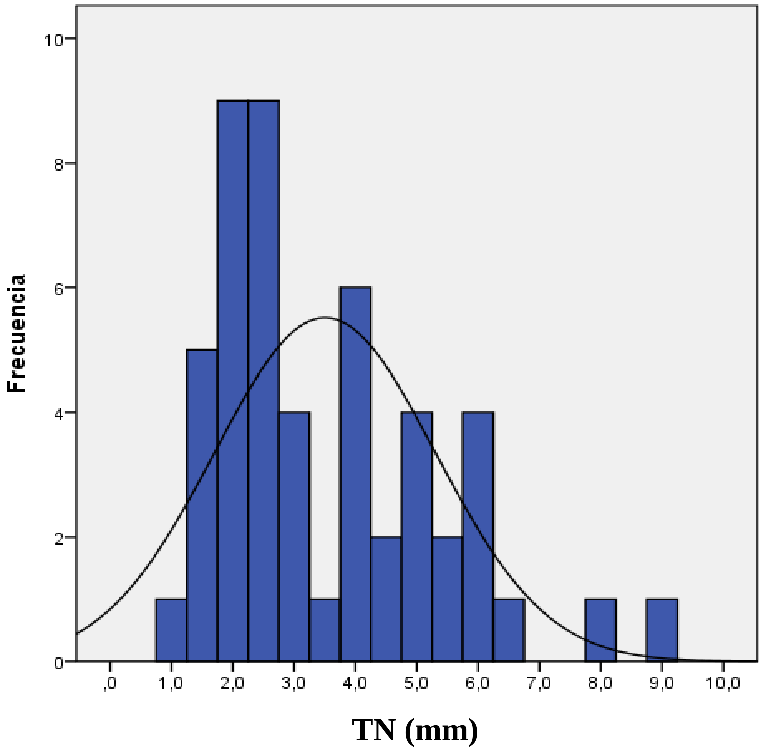


Figura 73. Distribución de la TN en fetos aneuploides.

El valor de la mediana de la TN de los fetos euploides es de 1.8 mm sensiblemente inferior a la mediana de los fetos que presentaban alguna anomalía cromosómica (Trisomía 21, 18 y 13) que fue de 3.5 mm (Tabla 17).

Tabla 17. Valor de la mediana de la medida de la TN en embarazos euploides y aneuploides.

Anomalía cromosómica	Trisomía 21	Trisomía 18	Trisomía 13	Euploides
Mediana TN (mm)(rango)	2.7 (1.4-6.5)	3.0 (1.0-9.0)	3.6 (1.9-5.8)	1.8 (0.9-5.6)

Se establecieron los percentiles 50^{th} (TN=1.8 mm), 95^{th} (TN=2.5 mm) y 99^{th} (TN=3.5 mm) en nuestra población. En los fetos euploides la translucencia nucal estaba por encima de los percentiles definidos en el 49.4%, 5.2% y 0.4% de los casos, respectivamente. Los valores respectivos para fetos afectos de trisomía 21 fueron 43.24%, 53.7% y 37.8% (Figura 74).

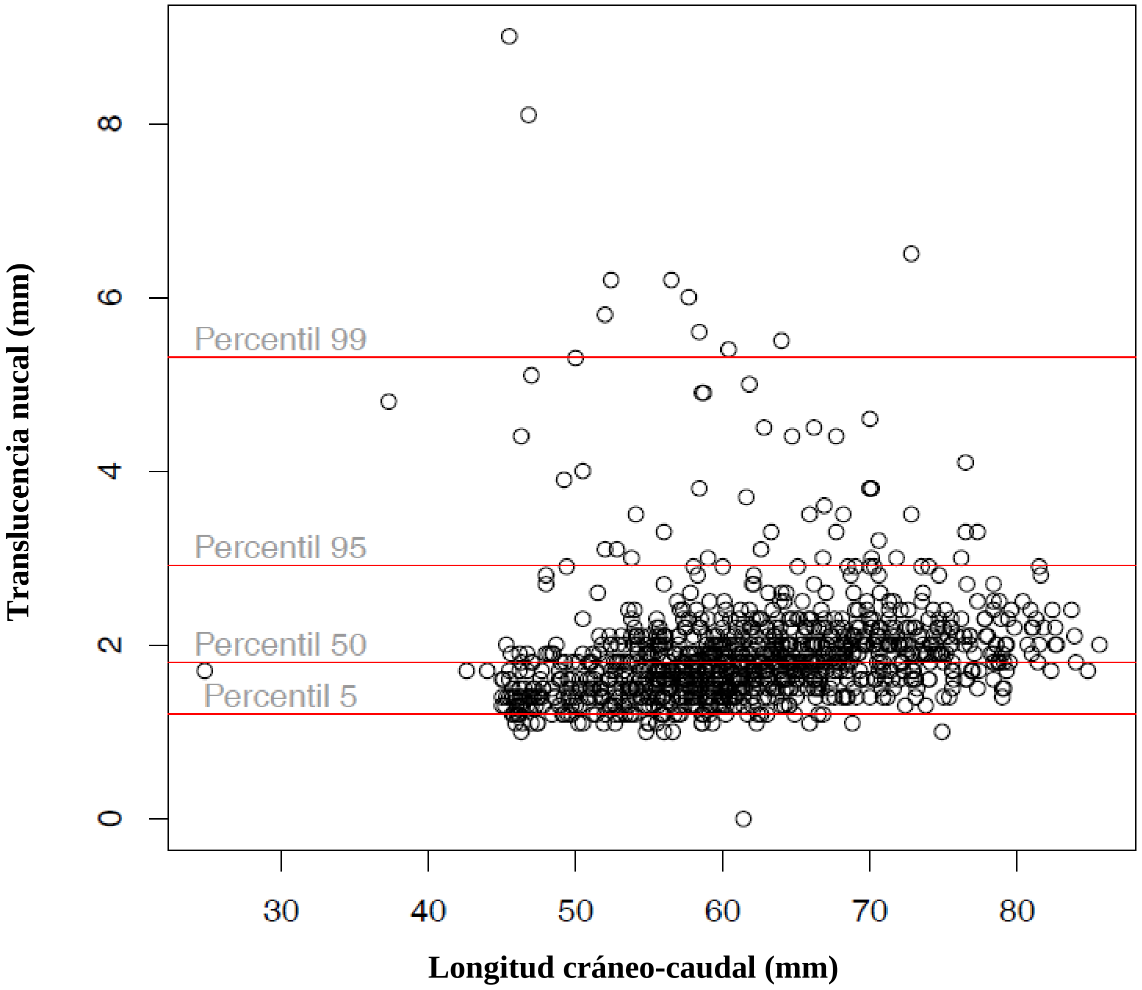


Figura 74. Distribución de la TN en relación a la longitud cráneo-caudal en fetos euploides y aneuploides.

En la población estudiada, la medición del grosor de la TN≥3.5 mm (p99) como marcador ecográfico individual podría detectar 14 de 37 (37.8%) casos de trisomía 21, 2 de 5 (40%) casos de trisomía 18 y 3 de 6 (50%) casos de trisomía 13, presentando una tasa de falsos positivos del 0.5% (Tabla 18).

Tabla 18. Tasas de detección y tasas de falsos positivos de la TN en las distintas anomalías cromosómicas.

	Tasas de Detección (n (%)) de:			
	Trisomía 21	**Trisomía 18**	**Trisomía 13**	**RFP (%)**
TN≥3.5 mm	14/37 (37.8)	2/5 (40)	3/6 (50)	0.5
TN≥2.5 mm	21/37 (56.7)	3/5 (60)	4/6 (66.6)	4.8

4.4. COMPORTAMIENTO DE LOS MARCADORES ECOGRÁFICOS SECUNDARIOS EN FETOS EUPLOIDES Y ANEUPLOIDES.

En la tabla 19 se muestra la tasa de detección de los marcadores ecográficos secundarios individuales (hueso nasal, regurgitación tricuspidea y ductus venoso) evaluados en fetos aneuploides, en el primer trimestre de gestación. La ausencia o hipoplasia del hueso nasal, regurgitación tricuspídea y ductus venoso se han identificado en el 17.24%, 52.38% y 13.33% respectivamente en los casos con trisomía 21; 40%, 100% y 33.33% en la trisomía 18 y 40%, 50% y 40% en casos con trisomía 13. Cada marcador pudo obtenerse en más del 95% de los casos y alguno de los tres marcadores en el 100% de los casos.

Tabla 19. Tasas de detección de los marcadores ecográficos secundarios individuales

	Trisomía 21			**Trisomía 18**			**Trisomía 13**		
	HN	**DV**	**RT**	**HN**	**DV**	**RT**	**HN**	**DV**	**RT**
Tasa de detección (n,%)	5/29 (17.24)	11/21 (52.38)	4/30 (13.33)	2/5 (40)	2/2 (100)	1/3 (33.33)	2/5 (40)	1/2 (50)	2/5 (40)

En la tabla 20 se muestran los casos en los que ha sido posible la realización de la valoración del hueso nasal, regurgitación tricuspídea y ductus venoso en fetos con trisomía 21.

Tabla 20. Número de casos en los que se ha realizado con éxito la exploración ecográfica de los marcadores secundarios por parte del especialista.

Marcadores secundarios	Trisomía 21
Hueso nasal anormal	4376/4629 (94.5%)
Regurgitación tricuspidea	3713/4629 (80.21%)
Ductus venoso invertido	4525/4629 (97.8%)

4.5. COMPORTAMIENTO DE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS MATERNOS EN FETOS EUPLOIDES Y ANEUPLOIDES.

La mediana de los valores de los múltiplos de la mediana (MoM) de la fβ-hCG y PAPP-A en la población cribada fue de 1.08 MoM y 1.02 MoM respectivamente (Tabla 21). La distribución de los valores de los MoM de la fβ-hCG y PAPP-A de la población cribada se muestran en las Figuras 75 y 76. En el grupo de gestantes con fetos afectos de Trisomía 21, la mediana de los valores de los MoM de la fβ-hCG y la PAPP-A expresado en múltiplos de la mediana, fue de 1.46 MoM y 0.33 MoM respectivamente (Tabla 21).

Tabla 21. Valor de la mediana de la medida de los marcadores bioquímicos en embarazos normales y afectados.

Marcadores Bioquímicos	Trisomía 21	Población cribada n=4629
fβ-hCG (Mediana (rango)) (MoM)	1.46 (0.5200-4.1800)	1.08 (0.0240-12.90)
PAPP-A (Mediana (rango)) (MoM)	0.33 (0.0400-4.4800)	1.02 (0.0400-8.34)

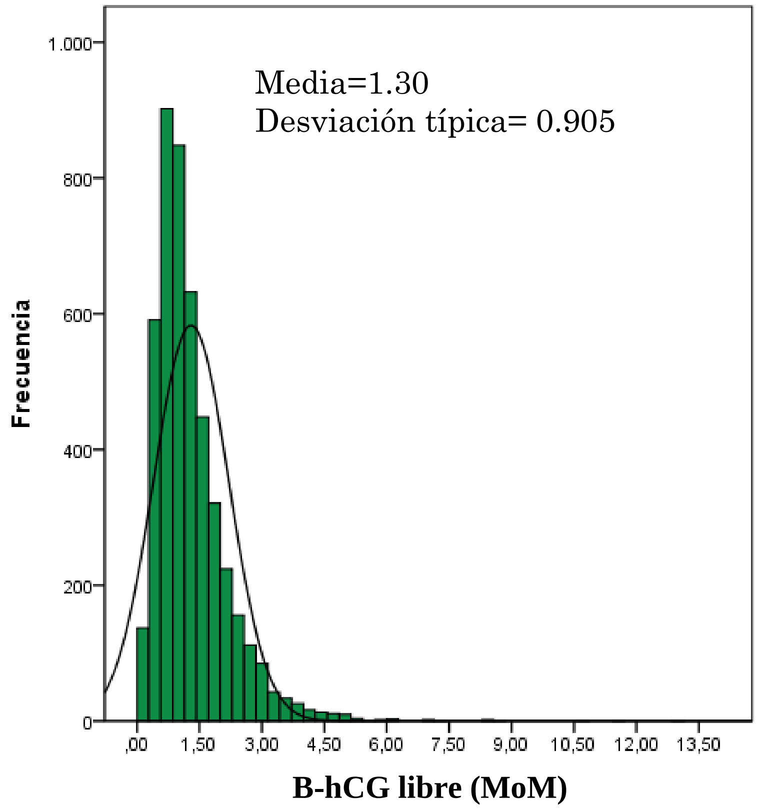


Figura 75. Distribución de los valores de los MoM de la β-hCG en la población cribada.

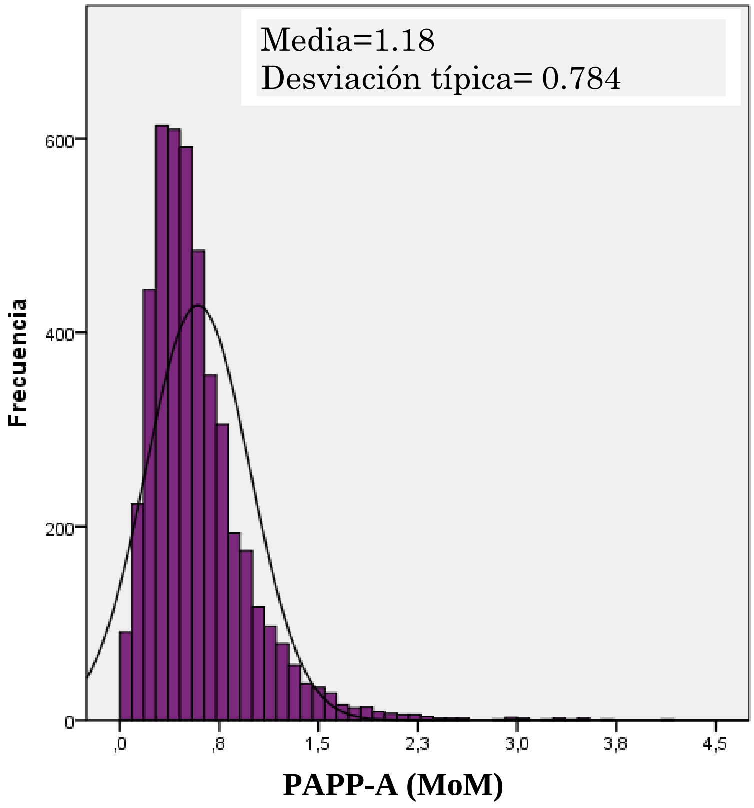


Figura 76. Distribución de los valores de la PAPP-A en la población cribada.

En la tabla 22 se resumen la tasa de detección de los marcadores bioquímicos individuales en pacientes con fetos afectos de trisomía 21, 18 y 13.

Tabla 22. Tasas de detección y tasas de falsos positivos de los marcadores bioquímicos.

Marcadores Bioquímicos	Tasas de Detección (n (%)) de: Trisomía 21	Trisomía 18	Trisomía 13	RFP (%)
β-hCG ≥2.5 MoM	11/36 (29.7)	0	2/5 (40)	4.8
PAPP-A<0.45 MoM	28/36 (77.8)	3/5 (60)	4/5 (80)	0.5

4.6. VALORACIÓN DE LOS MARCADORES ECOGRÁFICOS EN FETOS ANEUPLOIDES.

En las siguientes tablas se resumen la amplia variedad de anomalías fetales diagnosticadas entre las 11-13^{+}6 semanas de gestación en fetos aneuploides, tales como acrania/anencefalia, onfalocele, megavejiga, holoprosencefalia, labio leporino, hidrops, defectos cardiacos.

Tabla 23. Resumen ecográfico de la población estudiada.

Ecografía semana 20	N	%
Normal	4440	95.7
Anormal	111	2.4
No realizada	88	1.9
Total	4639	

Tabla 24. Marcadores ecográficos en fetos con Trisomía 21 (n=37)

Indicaciones	Normal	Anormal	No examinado
Ecografía semana 20	3 (8.1%)	15 (40,5%)	19 (51.3%)
Cráneo/cerebro	36 (97.3%)	-	1 (2.7%)
Columna	34 (91.9%)	15 (%)	3 (8.1%)
Corazón	26 (70.3%)	6 (16.2%)	5 (13.5%)
Pared abdominal	35 (94.6%)	-	2 (5.4%)
Estómago	33 (89.2%)	-	4 (10.8%)
Vejiga /riñones	31 (83.8%)	-	6 (16.2%)
Manos	36 (97.3%)	-	1 (2.7%)
Pies	35 (94.6%)	-	2 (5.4%)
Cordón	32 (86.5%)	-	5 (13.5%)

Tabla 25. Marcadores ecográficos en fetos con Trisomía 18 (n=5)

Indicaciones	Normal	Anormal	No examinado
Ecografía semana 20	-	1 (20%)	4 (80%)
Cráneo/cerebro	5 (100%)	-	-
Columna	5 (100%)	-	-
Corazón	1 (20%)	4 (80%)	-
Pared abdominal	3 (60%)	2 (40%)	-
Estómago	4 (80%)	-	1 (20%)
Vejiga/riñones	4 (80%)	-	1 (20%)
Manos	2 (40%)	3 (60%)	-
Pies	4 (80%)	-	1 (20%)
Cordón	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)

Tabla 26. Marcadores ecográficos en fetos con Trisomía 13 (n=6)

Indicaciones	Normal	Anormal	No examinado
Ecografía semana 20	-	2 (33.4%)	4 (66.7%)
Cráneo/cerebro	2 (33.3%)	2 (33.4%)	2 (33.3%)
Columna	5 (83.3%)	-	1 (16.7%)
Corazón	4 (66.7%)	-	2 (33.3%)
Pared abdominal	5 (83.3%)	-	1 (16.7%)
Estómago	5 (83.3%)	-	1 (16.7%)
Vejiga /riñones	3 (50%)	1 (16.7%)	2 (33.3%)
Manos	5 (83.3%)	-	1 (16.7%)
Pies	4 (66.7%)	-	2 (33.3%)
Cordón	4 (66.7%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)

Tabla 27. Marcadores ecográficos en fetos con Síndrome de Turner (n=2)

Indicaciones	Normal	Anormal	No examinado
Ecografía semana 20	-	1 (50%)	1 (50%)
Cráneo/cerebro	1 (50%)	-	1 (50%)
Columna	1 (50%)	-	1 (50%)
Corazón	-	-	2 (100%)
Pared abdominal	1 (50%)	-	1 (50%)
Estómago	1 (50%)	-	1 (50%)
Vejiga /riñones	-	-	2 (100%)
Manos	1 (50%)	-	1 (50%)
Pies	1 (50%)	-	1 (50%)
Cordón	2 (100%)	-	-

4.7. ANÁLISIS DE LOS CROMOSOMAS DE LAS PACIENTES QUE SE HAN REALIZADO UNA PRUEBA INVASIVA, DESPUES DE HABERSE SOMETIDO A UN CRIBADO PARA LA DETECCIÓN DE RIESGO DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS (Periodo de Mayo de 2009 hasta diciembre de 2012).

Durante los cuatro primeros años (2009-2012) en los que se ha llevado a cabo el estudio se han analizado los cromosomas de un total de 928 muestras prenatales mediante la técnica QF-PCR, para el diagnóstico prenatal rápido de las aneuplodías de los cromosomas 21, 13, 18, X e Y. También se han analizado mediante el cariotipo convencional, lo que nos ha permitido evaluar las ventajas y limitaciones de la aplicación de la técnica molecular. Se han procesado un total de 349 (37.6%) líquidos amnióticos y 579 (62.4%) vellosidades coriales (Figura 77).

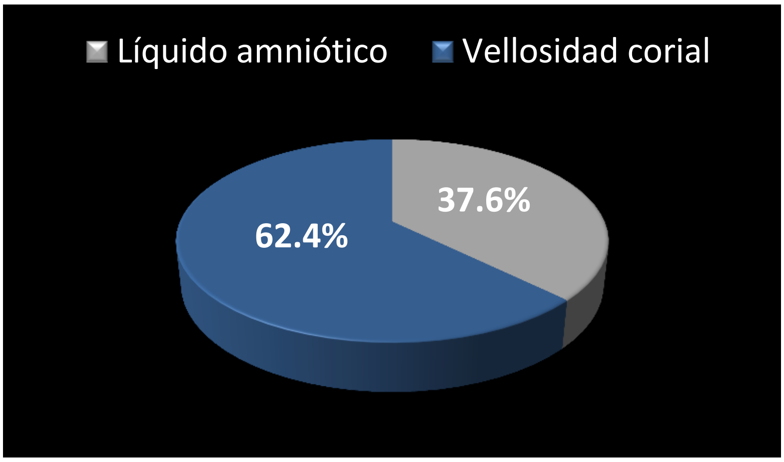


Figura 77. Muestras procesadas en el laboratorio.

Durante el año 2009, 2010, 2011 y 2012 se realizaron respectivamente 122, 168, 250 y 388 pruebas invasivas, cifras que han ido aumentando ligeramente (Gráfico 78).

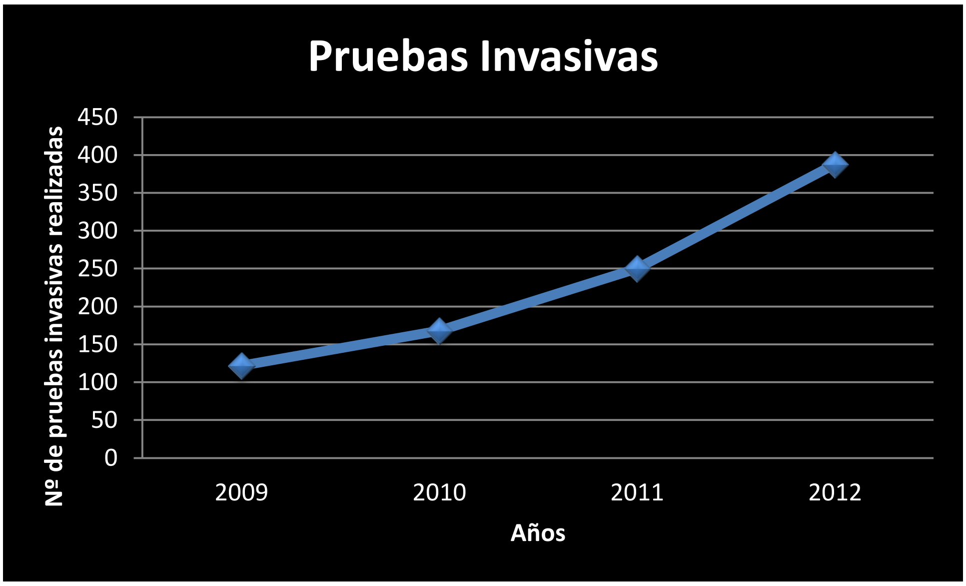


Gráfico 78. Evolución en el número de biopsias coriales y/o amniocentesis realizadas prenatalmente durante los años 2009-2012.

4.7.1. Detección de muestras euploides.

El análisis mediante la técnica QF-PCR se ha realizado con éxito en 916 (98.7%) muestras dentro de las 24-48 horas desde su recogida, siendo no concluyentes un total de 12 (1.3%) muestras, debido a la contaminación con sangre materna. El análisis citogenético convencional se ha obtenido en 905 (97.5%) muestras, y no fue posible en 23 (2.5%) muestras debido al fracaso en el cultivo celular y/o al escaso crecimiento celular, no pudiendo estudiar el mínimo establecido de 6 metafases para dar un resultado concluyente. En su lugar se realizó la técnica FISH.

El resultado de la QF-PCR fue normal en 821 (88.5%) muestras y el análisis del cariotipo convencional fue normal en 797 (85.9%) muestras. En la tabla 28 se enumeran las anomalías cromosómicas detectadas por QF-PCR y cariotipo convencional. El sexo fetal se ha determinado mediante los marcadores 7X, DXS1187, DXS981, DXS6809, AMEL, DXY267XY2 y SRY (Figura 79 y 80).

Tabla 28. Resultados de las pruebas de 928 muestras prenatales por cariotipo y análisis QF-PCR.

Cariotipo	Análisis QF-PCR	Análisis Citogenético
46,XX; 46,XY	821	797
Aneuploidías autosómicas comunes		
47,XX,+21; 47,XY,+21	61[1]	58
47,XX,+18; 47,XY,+18	15	15
47,XX,+13; 47,XY,+13	9[2]	7
Otras aneuploidías		
45,X	6	6
47,XXY	1	1
Triploidía 69,XXX	3	3
Mosaico	-	4
Otras trisomías autosómicas (9,2)	-	2
Anomalías estructurales equilibradas	-	9
Anomalías estructurales no equilibradas	-	3
Pruebas fallidas	12	23
Anomalías totales	95	108

[1]3 casos diagnosticados como trisomía 21 por QF-PCR fueron 2 mosaicos de trisomía 21 y 1 Translocación robersoniana no balanceada.

[2]2 casos diagnosticados como trisomía 13 por QF-PCR fue un mosaico de trisomía 13 y 1 Translocación robersoniana no balanceada.

Marker	Alleles	Allele Length	Peak Area	Peak Ratio	Check
13A	2	267.3:284.6	11232:11825	0.95	
13B	2	403:416.4	10493:10623	0.99	
13C	2	454.4:462.0	7723:6843	1.13	
13D	2	447.6:455	13131:11663	1.13	
18B	2	210:214	7282:6946	1.05	
18C	2	320:332.8	16639:13904	1.20	
18D	2	359:383	17475:14486	1.21	
18J	1	462	15635		
18M	2	367.1:379.0	9691:9240	1.05	
21A	2	182.8:186.8	9707:8606	1.13	
21B	2	240:248	13669:13002	1.05	
21C	2	293.4:302	5433:5556	0.98	
21D	2	469.0:480.8	11984:11591	1.03	
21H	2	390.7:394.8	10472:9968	1.05	
21I	2	129:137	4250:3613	1.18	
7X	3 (2:1)	182.8:203.3	11040:5940	1.86	
X1	1	148	20952		
X2	1	248.7	5936		
X4	1	314.8	8820		
XY1	2	104.9:110.8	12688:11272	1.13	
XY2	2	196:204	11535:13156	0.88	
Y1	1	236	3326		

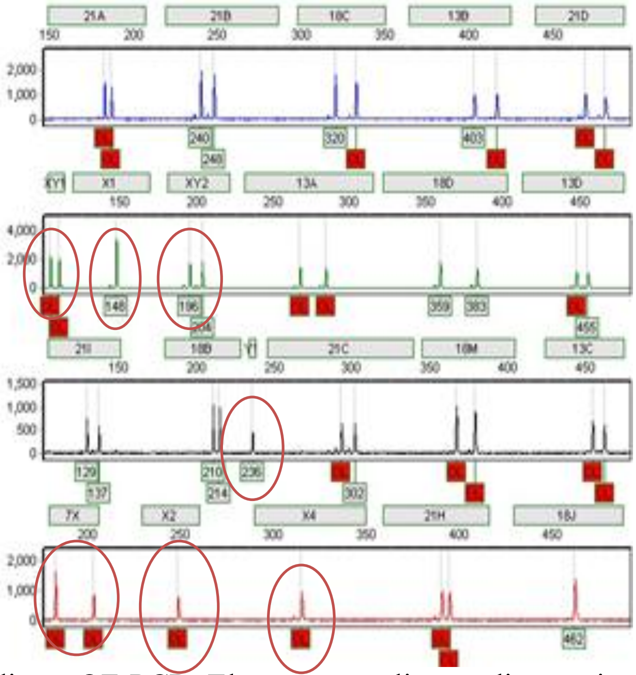


Figura 79. Niño normal detectado mediante QF-PCR. El sexo masculino se diagnostica por la presencia del producto Y específico del marcador AMEL y de la presencia del marcador SRY.

Marker	Alleles	Allele Length	Peak Area	Peak Ratio	Check
13A	2	264:267.2	16027:12847	1.25	
13B	2	397:407	12465:11764	1.06	
13C	2	455:459	7852:6667	1.18	
13D	2	440.0:447.7	14276:13705	1.04	
18B	2	206.8:210.9	7373:6739	1.09	
18C	1	329.0	33511		
18D	2	355:374.2	22577:18591	1.21	
18J	1	462	22904		
18M	2	368:372	11655:11218	1.04	
21A	2	179.3:192	12004:10392	1.16	
21B	2	252.6:254	16052:17039	0.94	
21C	2	294:315.0	6773:6153	1.10	
21D	2	462:466	17278:14250	1.21	
21H	1	395.4	23977		
21I	1	117	11419		
7X	2	183.1:204	9724:9551	1.02	
X1	2	144:152	16693:17622	0.95	
X2	2	246:250	12713:10676	1.19	
X4	2	320:324	12957:12231	1.06	
XY1	1	105.0	31896		
XY2	2	200:204	12270:10796	1.14	
Y1	0				

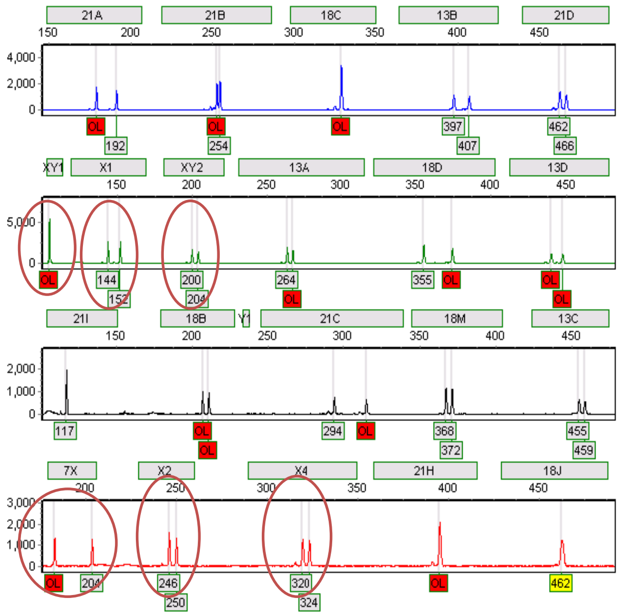


Figura 80. Niña normal detectada mediante QF-PCR. El sexo femenino se diagnostica por la ausencia del producto Y específico del marcador AMEL y de la secuencia SRY.

4.7.2. Detección de aneuploidías.

Un total de 95 (10%) fetos con anomalías de los cromosomas 21, 18, 13, X e Y se han diagnosticado fácilmente por el ensayo QF-PCR, en relación al cariotipo convencional que ha detectado 108 (11.6%) fetos con anomalías cromosómicas (Tabla 28). Las aneuploidías cromosómicas más comunes (Trisomía 21, 18 y 13) representaron en nuestro estudio el 74% de todas las anomalías detectadas por el análisis citogenético.

En nuestra experiencia, la técnica QF-PCR tiene una tasa de detección del 88% de todas las anomalías detectadas mediante un estudio citogenético convencional. La tasa de detección de la QF-PCR fue del 100% para las aneuploidías de los cromosomas 21, 18, 13, X e Y. No se han detectado falsos positivos. La capacidad técnica de la QF-PCR para la detección de anomalías cromosómicas se detalla en la Tabla 29.

Tabla 29. Eficiencia de la QF-PCR en las muestras analizadas.

Parámetro	Tasa de detección
Sensibilidad	88%
Detección de anomalías clínicamente significativas	95%
Especificidad (21, 18, 13, X e Y)	100%
Valor predictivo positivo	100%
Valor predictivo negativo	100%

De las 95 anomalías cromosómicas identificadas por la técnica QF-PCR, 61 corresponden a fetos con trisomía 21 (Figura 81). El cariotipo ha confirmado estos resultados, sin embargo, ha revelado que 3 casos de los 61 detectados por la QF-PCR como trisomía 21, no corresponden a una trisomía 21 completa, sino que 2 casos son trisomías 21 en mosaico y 1 es una translocación robertsoniana no balanceada 14;21 que ha dado lugar a una trisomía 21.

Marker	Alleles	Allele Length	Peak Area	Peak Ratio	Check
13A	1	260	22127		
13B	2	397:419	12022:11782	1.02	
13C	2	455:463	7883:7520	1.05	
13D	2	451:459	13155:13946	0.94	
18B	2	206:210.7	6877:6656	1.03	
18C	2	320.6:333.0	17212:15287	1.13	
18D	2	363.8:389.7	18841:15435	1.22	
18J	1	462	16952		
18M	1	371.3	18419		
21A	3 (1:1:1)	187.2:191.2:19	9549:9177:8315		
21B	3 (2:1)	244:258	26075:14377	1.81	
21C	3 (2:1)	298:302	12530:5742	2.18	
21D	3 (1:1:1)	466:470:476.6	14224:12174:14049		
21H	3 (1:2)	387.2:391.3	11326:19805	0.57	
21I	3 (1:2)	129:137	4145:6991	0.59	
7X	3 (2:1)	183.0:204	11808:6403	1.84	
X1	1	152	18783		
X2	1	246	8526		
X4	1	328	8971		
XY1	2	105.0:110.8	12097:11592	1.04	
XY2	2	196:200	11076:11510	0.96	
Y1	1	236	4927		

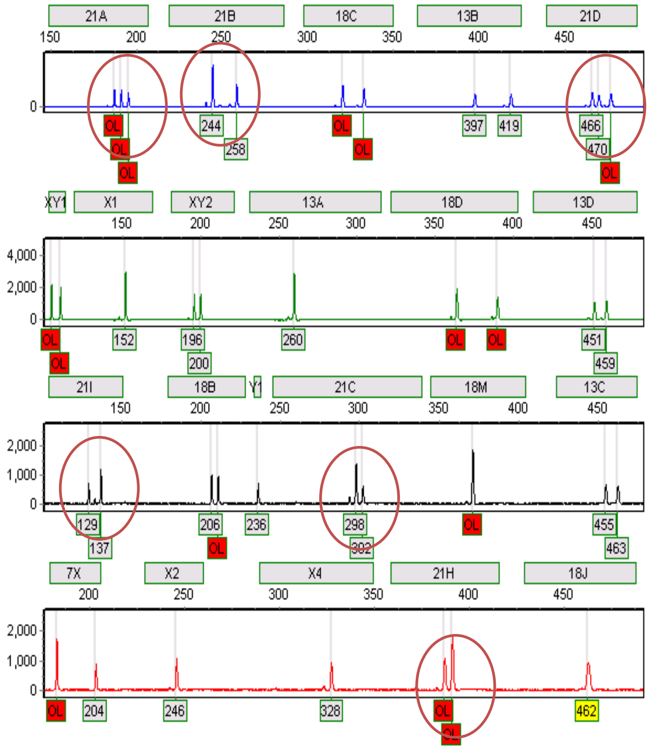


Figura 81. Análisis de la QF-PCR que muestra la detección de un feto con 47,+XY,+21. De los 6 STRs analizados del cromosoma 21, se detectó un patrón trialélico en una proporción 1:1:1 para los marcadores D21S1435, D21S1444. Los marcadores D21S11, D21S1437, D21S1411, D21S1442 presentaron un patrón dialélico en una proporción 2:1 o 1:2. Los círculos en rojos identifican los marcadores informativos.

La QF-PCR ha identificado 15 (1.6%) fetos con trisomía 18 (Figura 82) y 9 (1%) fetos con trisomía 13 (Figura 83). En este último caso, el cariotipo ha revelado que 2 casos no corresponden a una trisomía 13 completa, sino que un caso es un mosaico de trisomía 13 y otro una trisomía 13 por Translocación Robertsoniana 13;14 no balanceada.

Marker	Alleles	Allele Length	Peak Area	Peak Ratio	Check
13A	2	269.3:284.8	11467:9506	1.21	
13B	2	401:405	10879:9935	1.10	
13C	1	455	10753		
13D	1	451.8	22466		
18B	3 (1:2)	206:210	5488:9612	0.57	
18C	2	324.7:328.8	21953:12566	1.75	?
18D	3 (1:1:1)	360.2:382.3:38	15492:14371:13526		
18J	3 (1:1:1)	459.2:463.2:46	7013:6819:8594		
18M	3 (1:1:1)	367.3:371.2:37	6488:5906:6615		
21A	2	178.9:191.0	8769:6499	1.35	
21B	2	244:248	14199:11137	1.27	
21C	2	294:306	6173:5631	1.10	
21D	2	466:470	13853:10471	1.32	
21H	1	387.0	17754		
21I	2	129:137	4401:4468	0.99	
7X	3 (2:1)	183.0:204	11226:5533	2.03	
X1	1	152	14147		
X2	1	248.9	5989		
X4	1	324	5727		
XY1	2	104.9:110.7	10151:8532	1.19	
XY2	2	192:200	9213:8691	1.06	
Y1	1	236	2301		

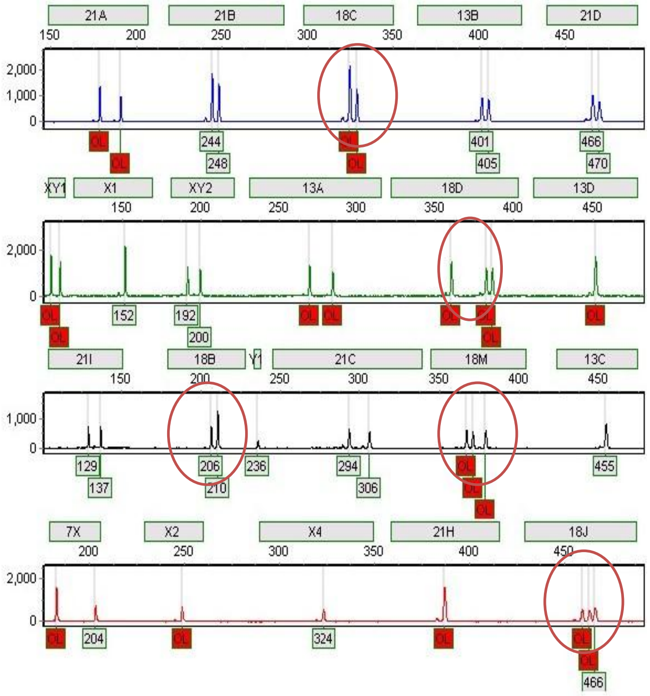


Figura 82. Análisis de la QF-PCR que muestra la detección de un feto con 47,+XY,+18. De los 5 STRs analizados del cromosoma 18, se detectó un patrón trialélico en una proporción 1:1:1 para los marcadores D18S386, GATA178F11 y D18S976, los marcadores D18S535 y D18S978 presentaron un patrón dialélico en una proporción 2:1 o 1:2. Los círculos en rojos identifican los marcadores informativos.

Marker	Alleles	Allele Length	Peak Area	Peak Ratio	Check
13A	3 (1:2)	267.3:273.0	4063:6888	0.59	
13B	3 (2:1)	401:405	8164:3487	2.34	
13C	3 (2:1)	431:459	6072:2703	2.25	
13D	3 (1:2)	443.8:455	5037:9749	0.52	
18B	2	206.6:214.8	1734:1878	0.92	
18C	2	324.8:328.9	4976:4559	1.09	
18D	1	355	12961		
18J	1	462	6530		
18M	2	367.4:379.4	2958:3481	0.85	
21A	1	187.3	6016		
21B	2	248:258	4326:4998	0.87	
21C	2	306.6:319.2	2425:2402	1.01	
21D	2	462:477.3	5834:5290	1.10	
21H	2	387.1:391.2	4436:3837	1.16	
21I	2	117:121	1460:1234	1.18	
7X	3 (2:1)	182.9:204	3780:1813	2.08	
X1	1	148	5403		
X2	1	245.0	2176		
X4	1	336	2083		
XY1	2	104.9:110.7	3056:3278	0.93	
XY2	2	196:200	2858:3207	0.89	
Y1	1	236	1379		

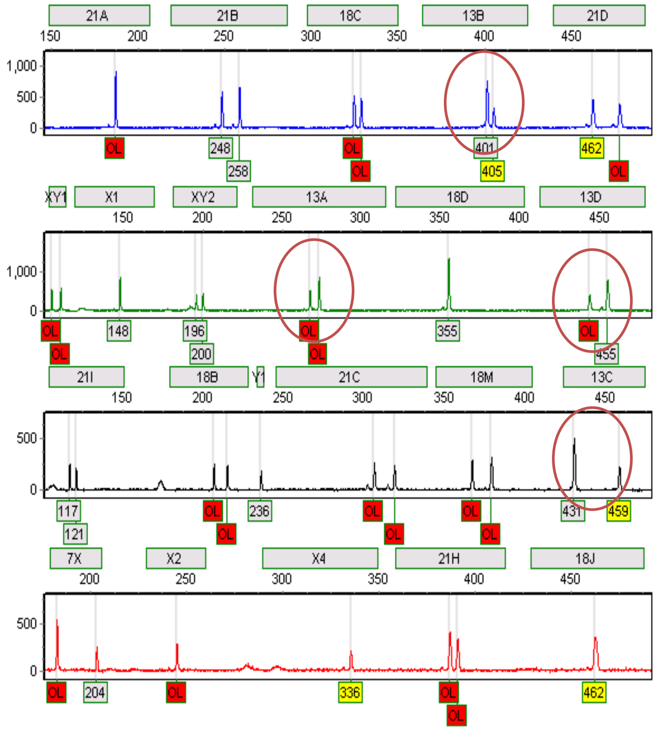


Figura 83. Análisis de la QF-PCR que muestra la detección de un feto con 47,+XY,+13. De los 4 STRs analizados del cromosoma 13, se detectó un patrón dialélico en una proporción 2:1 o 1:2 en los marcadores D13S742, D13S634, D13S628 y D13S305. Los círculos en rojos identifican los marcadores informativos.

El diagnóstico del síndrome de Turner se basa en la detección mediante QF-PCR de un solo pico en los marcadores polimórficos DXYS267, DXS1187, DXS981, DXS6809 y en la ausencia de Y del producto de amelogenina y SRY. El marcador 7X permite hacer una cuantificación relativa de los cromosomas 7 y X. En una hembra normal el ratio esperado 7X es 1:1 y en varones normales y hembras con monosomía X se muestra un ratio 2:1 (Figura 84). La detección del síndrome de Turner mediante QF-PCR tuvo éxito en 6 de los 6 casos identificados mediante cariotipo (Tabla 28).

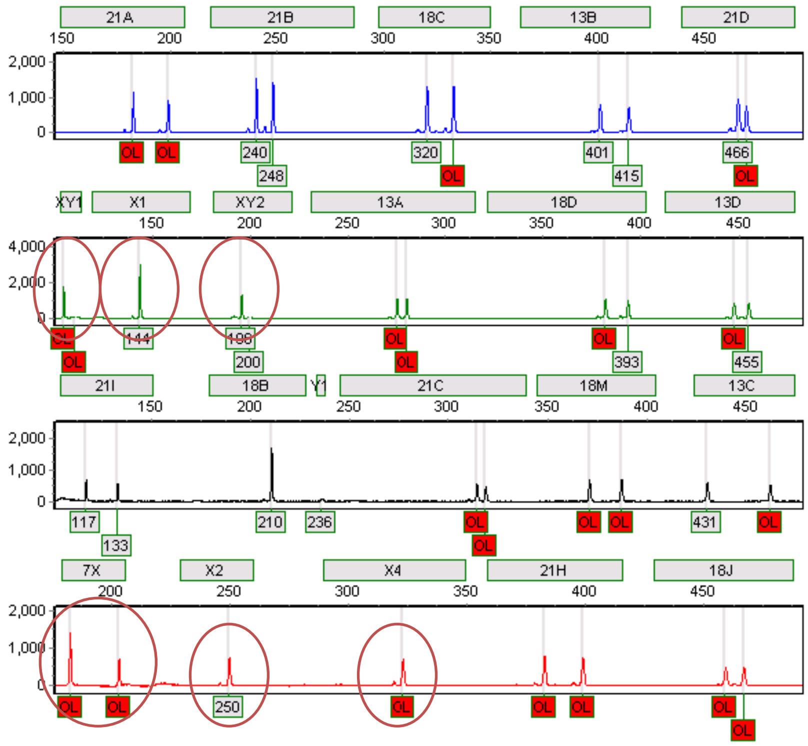


Figura 84. Análisis de la QF-PCR que muestra la detección de un feto con 45,X0. Todos los marcadores X y XY muestran un perfil homocigoto. El marcador 7X muestra un ratio 2:1. Los círculos en rojos identifican los marcadores informativos.

Como se muestra en la Tabla 30, el cariotipo convencional ha identificado un feto con síndrome de Klinelfelter (47,XXY) identificado correctamente por QF-PCR, y

3 fetos con triploidía (69,XXX), también fácilmente identificados por la QF-PCR (Figura 85).

Marker	Alleles	Allele Length	Peak Area	Peak Rati	Check
13A	3 (2:1)	270:282.6	41230:19698	2.09	
13B	3 (2:1)	395:417	56324:24233	2.32	
13C	3 (2:1)	453:457	16701:8197	2.04	
13D	3 (1:2)	449:453	23945:37860	0.63	
18B	1	211.4	57213		
18C	3 (1:2)	330:334	36501:63258	0.58	
18D	3 (1:1:1)	351:376.3:387	30463:24631:23579		
18J	1	460	59421		
18M	3 (1:2)	370:378	19184:37872	0.51	
21A	3 (2:1)	188:192	25701:11475	2.24	
21B	3 (1:1:1)	240:252:262	24024:17799:17292		
21C	3 (1:1:1)	294.6:302.7:3	11313:11817:10419		
21D	3 (1:2)	460:468	20383:37794	0.54	
21H	3 (1:2)	385.1:393.2	23908:45852	0.52	
21I	3 (1:1:1)	125:137:141	8956:9025:8298		
7X	2	183.3:204	18259:13394	1.36	
X1	2	144:152.8	26452:24831	1.07	
X2	2	246:250	18829:15142	1.24	
X4	2	324:328	26847:22429	1.20	
XY1	3 (2:1)	104.8:110	42789:22913	1.87	
XY2	3 (1:2)	196:200	36731:58075	0.63	
Y1	0				

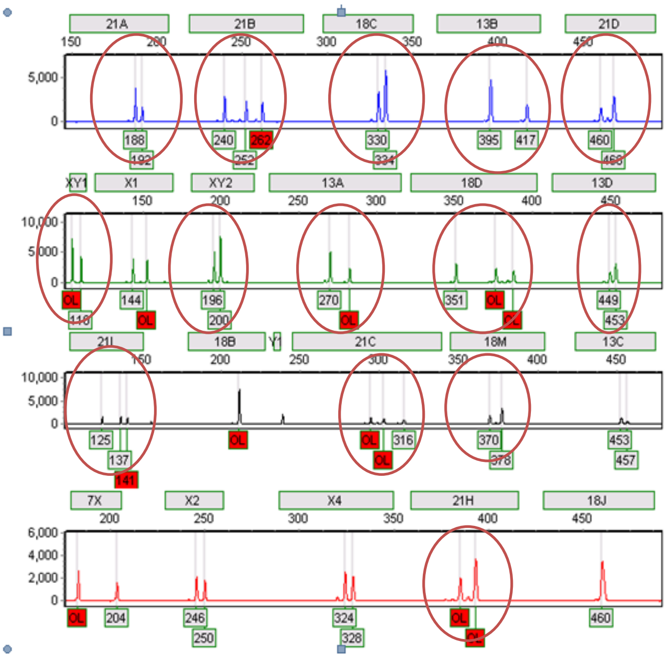


Figura 85. Análisis de la QF-PCR que muestra la detección de una triploidía. Los marcadores analizados en los cromosomas presentan un patrón trialélico o dialélico.

4.7.3. Detección de otras anomalías cromosómicas.

Como se muestra en la Tabla 28 el cariotipo convencional detectó 2 casos de aneuploidías que no fueron detectadas por la QF-PCR debido a las limitaciones propias de esta técnica: trisomía 2 (47,XX,+2) y trisomía 9 (47,XY,+9). Ambas, presentaron un mal pronóstico para el feto. Ecográficamente la trisomía 9 presentó el hueso nasal ausente/hipoplásico y los dedos de las manos superpuestos. La trisomía 2 presentó onfalocele con contenido intestinal y hepático, y el corazón desplazado caudalmente. El resultado fue muerte fetal para ambos casos.

El cariotipo identificó 12 casos de anomalías cromosómicas estructurales: 9 corresponden a translocaciones aparentemente equilibradas y 3 a translocaciones no equilibradas. La QF-PCR diagnosticó dos de los tres casos con anomalías

cromosómicas desequilibradas como anormales. Las Tablas 30 y 31 describen los casos de anomalías cromosómicas estructurales equilibradas y no equilibradas diagnosticadas mediante cariotipo.

Tabla 30. Cariotipos anormales con **translocaciones equilibradas** en muestras prenatales.

Cariotipo anormal	Comentarios
46,XY,t(4;22)(q33;q13.1)	Cariotipo que presenta una población celular uniforme de 46 cromosomas, de sexo masculino, observándose una translocación recíproca entre los brazos largos de un cromosoma 4, con un punto de rotura q33, y los brazos largos de un cromosoma 22, con un punto de rotura q13.1. Confirmado mediante técnica de FISH específica para el cromosoma 22q13. (Figura 86)
46,XY,t(17;19)(q21.1;p13.3)	Cariotipo que presenta una población celular uniforme de 46 cromosomas de sexo masculino, observándose una translocación recíproca entre los brazos largos de un cromosoma 17, con un punto de rotura q21.1 y los brazos cortos de un cromosoma 19, con un punto de rotura p13.3. (Figura 87).
46,XY,t(17;19)(q21.1;p13.3)	Cariotipo que presenta una población celular uniforme de 46 cromosomas de sexo masculino, observándose una translocación recíproca entre los brazos largos de un cromosoma 17, con un punto de rotura q21.1 y los brazos cortos de un cromosoma 19, con un punto de rotura p13.3. (Figura 88).
46,XY,inv(9)(phqh)	Cariotipo que presenta una población celular uniforme de 46 cromosomas, de sexo masculino, observándose una inversión pericéntrica en un cromosoma 9. Sin repercusión fenotípica conocida (Figura 89).
46,XX,inv(9)(phqh)	Cariotipo que presenta una población celular uniforme de 46 cromosomas, de sexo femenino, observándose una inversión pericéntrica en un cromosoma 9. Sin repercusión fenotípica conocida (Figura 90).

45,XX,der(13;14)(q10;q10)	Cariotipo que presenta una población celular uniforme de 45 cromosomas, de sexo femenino, observándose una translocación Robertsoniana entre un cromosoma 13 y un cromosoma 14 (Figura 91).
45,XY,der(13;14)(q10;q10)	Cariotipo que presenta una población celular uniforme de 45 cromosomas, de sexo masculino, observándose una translocación Robertsoniana entre un cromosoma 13 y un cromosoma 14 (Figura 92).
46,X,Yqs	Cariotipo que presenta una población celular uniforme de 46 cromosomas, de sexo masculino, observándose satélites en la zona distal de los brazos largos del cromosoma Y (Figura 93).
45,XY,der(14;21)(q10;q10)	Cariotipo que presenta una población celular uniforme de 45 cromosomas de sexo masculino, observándose una translocación Robertsoniana entre un cromosoma 14 y un cromosoma 21 (Figura 94).

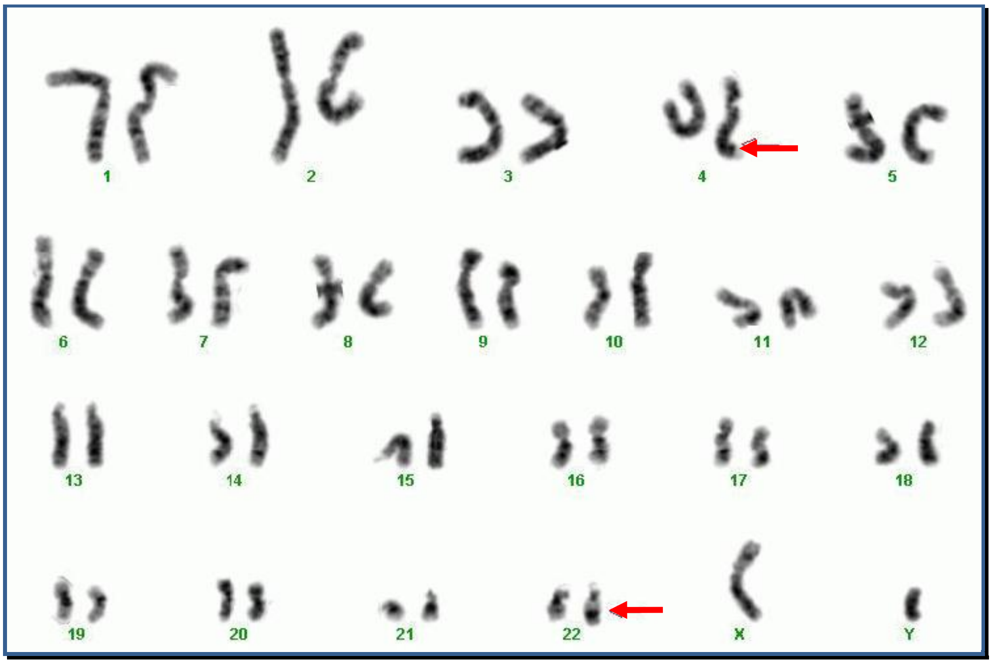


Figura 86. Cariotipo que presenta una Translocacion aparentemente equilibrada 4;22.

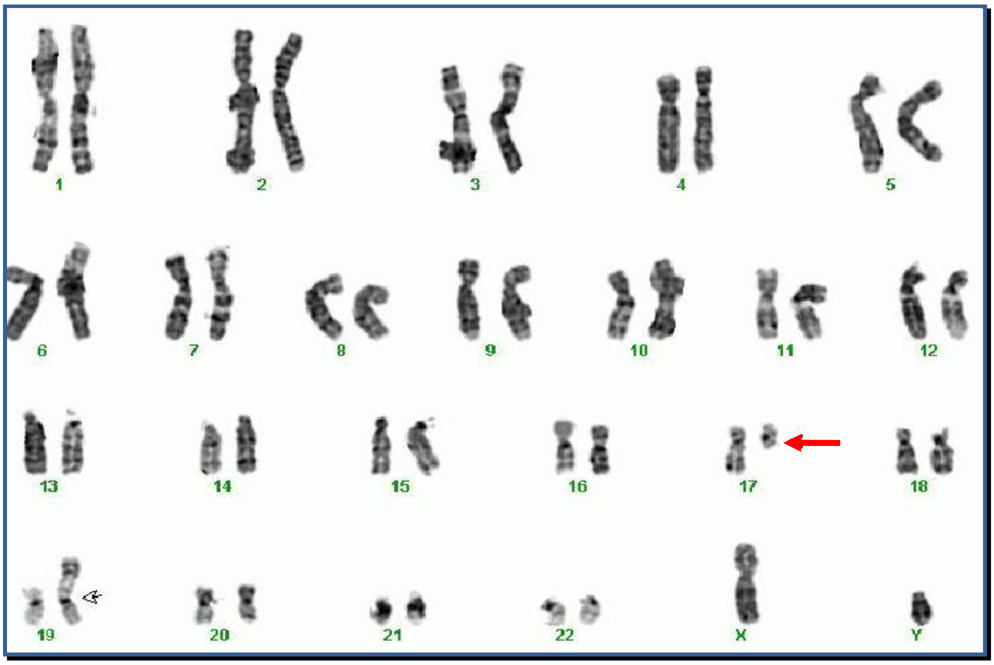


Figura 87 y Figura 88. Cariotipo que presenta una Translocacion aparentemente equilibrada 17;19**.**

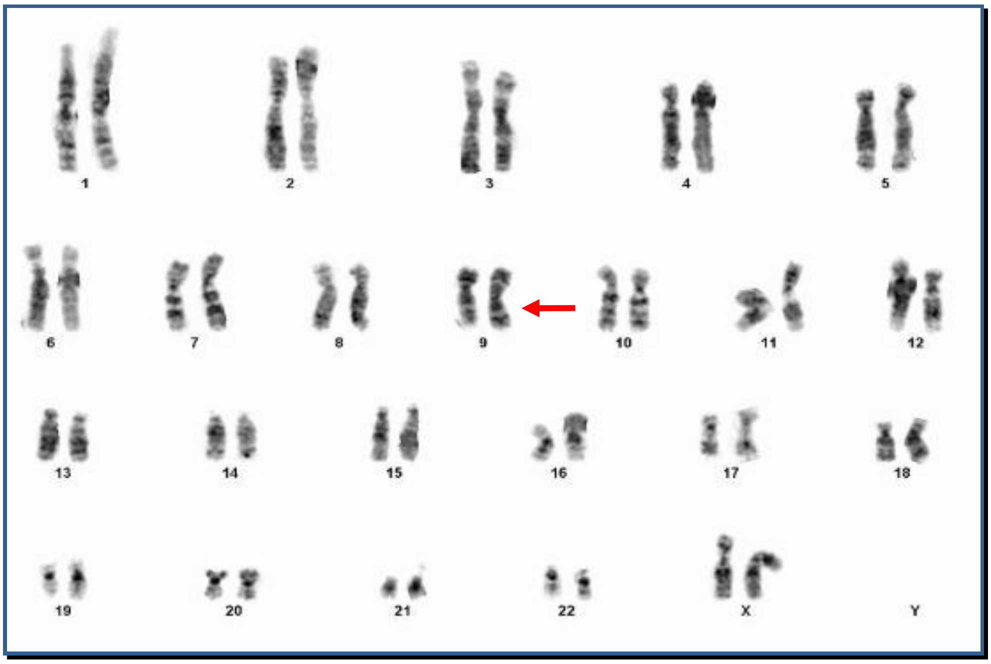


Figura 89 y Figura 90. Cariotipo que presenta una inversión del cromosoma 9.

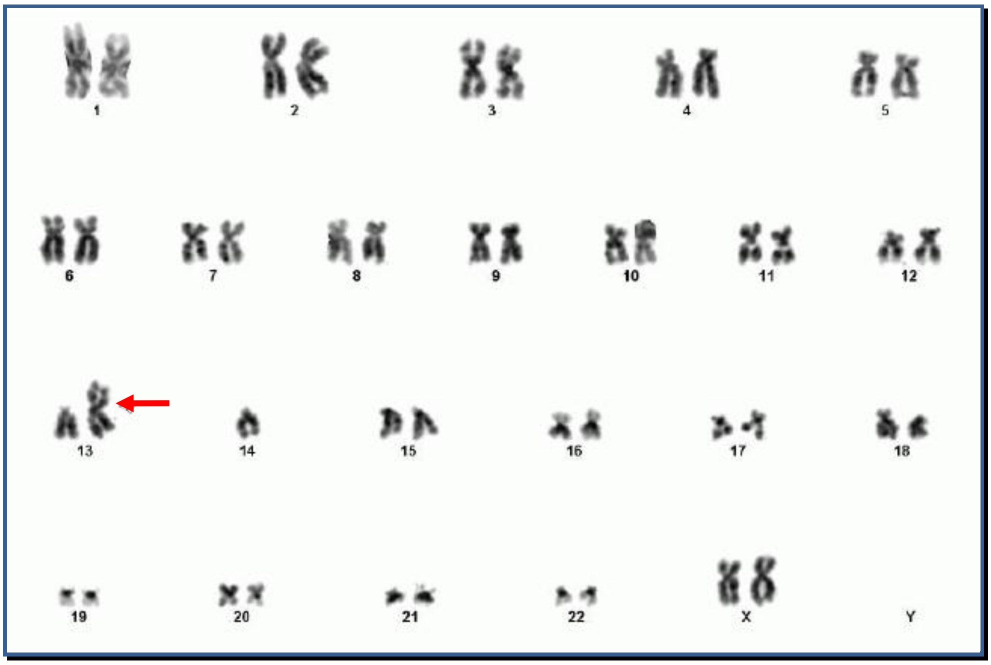


Figura 91. Cariotipo que presenta una Translocación robertsoniana 13;14**.**

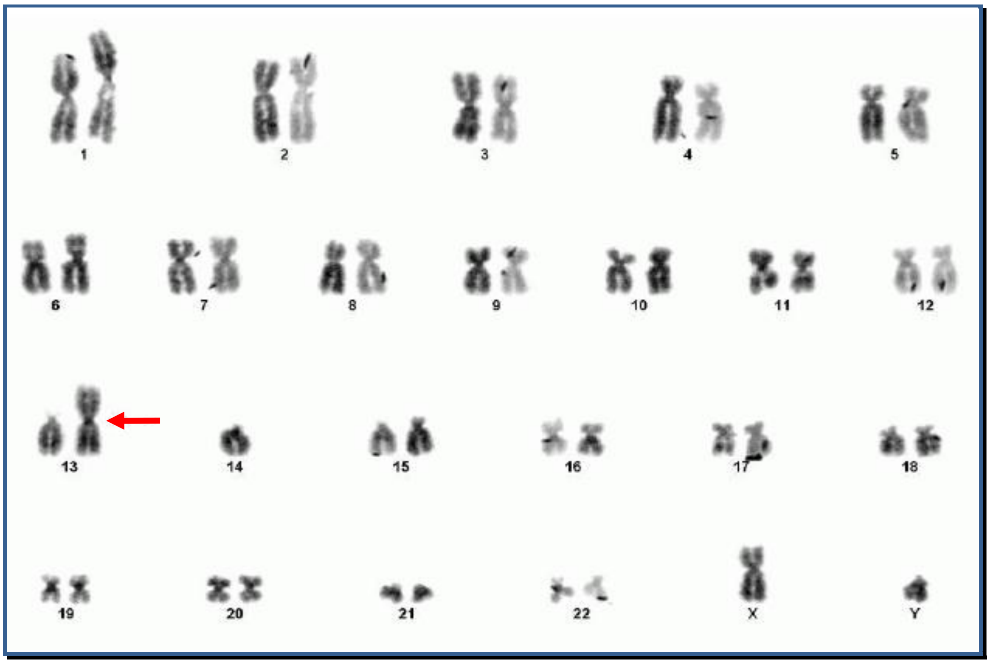


Figura 92. Cariotipo que presenta una Translocación robertsoniana 13;14**.**

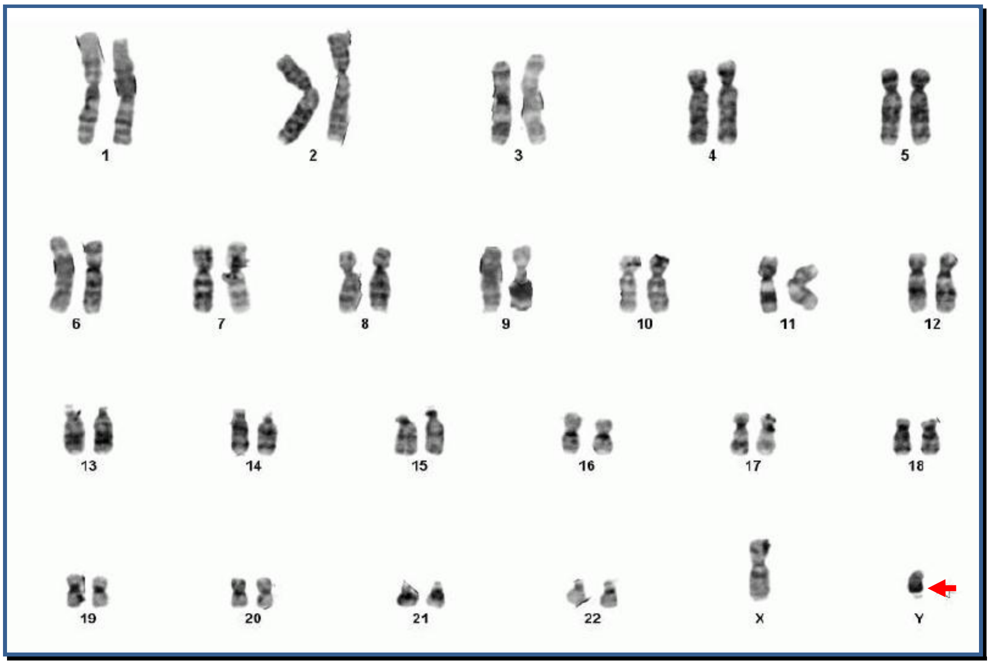


Figura 93. Cariotipo que presenta un Cromosoma y satelitar.

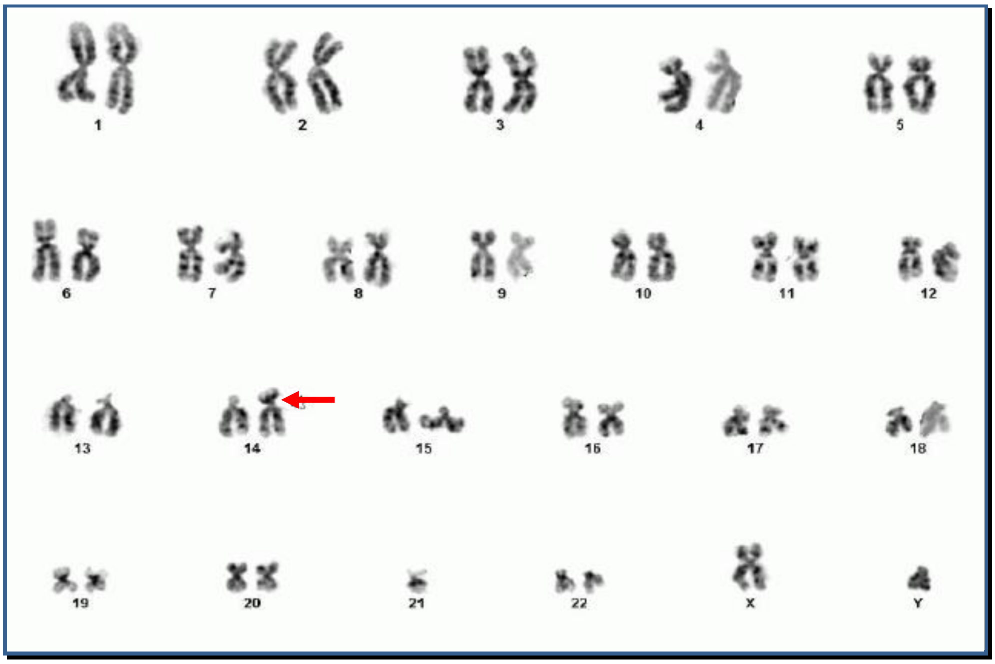


Figura 94. Cariotipo que presenta una Translocacion robertsoniana, 14;21.

Tabla 31. Cariotipos anormales con **translocaciones no equilibradas** en muestras prenatales.

Cariotipo fetal anormal	Comentarios
46,XY,der(14;21)(q10;q10),+21	Cariotipo que presenta una población celular uniforme de 46 cromosomas, de sexo masculino, observándose una translocación robertsoniana, entre un cromosoma 14 y un cromosoma 21, observándose tres cromosomas 21 (Figura 95).
46,XX,+13,der(13;14)(q10;q10)	Cariotipo que presenta una población celular uniforme de 46 cromosomas, de sexo femenino, observándose una translocación robertsoniana, entre un cromosoma 13 y un cromosoma 14, observándose tres cromosomas 13 (Figura 96).
45,XX,der(13;18)(?;?),-18	Cariotipo que presenta una población celular uniforme de 45 cromosomas de sexo femenino, observándose una translocación entre un cromosoma 13 y un cromosoma 18, formando un cromosoma derivativo. Se ha efectuado técnica de FISH específica para el centrómero y telómero de brazos cortos del cromosoma 18, observándose dos centrómeros y solo un telómero. Por la que existiría una deleción de brazos cortos del cromosoma 18, sin poder confirmar el punto de rotura (Figura 97).

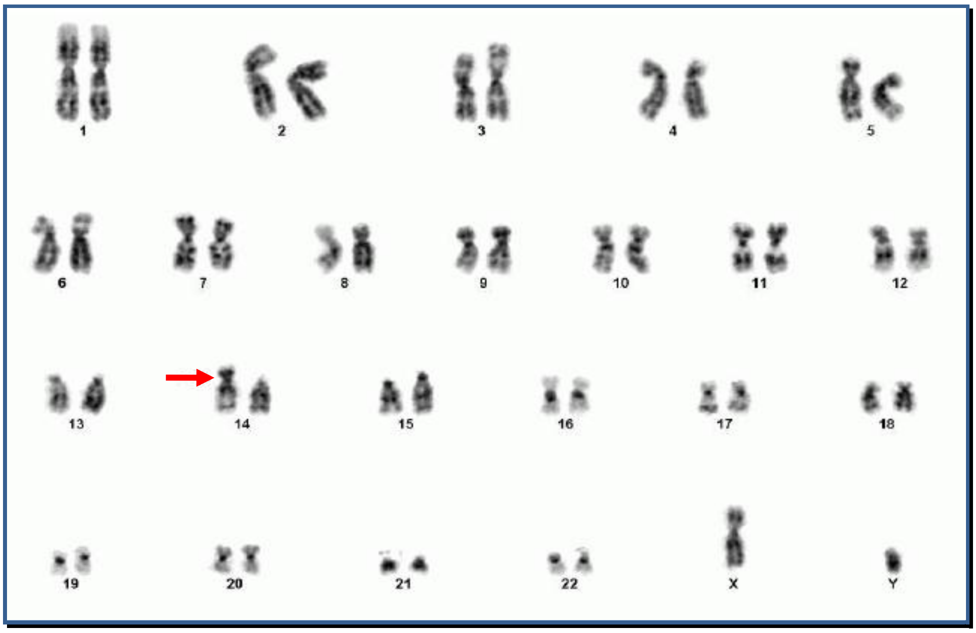


Figura 95. Cariotipo que presenta una translocación robertsoniana 14;21 no equilibrada

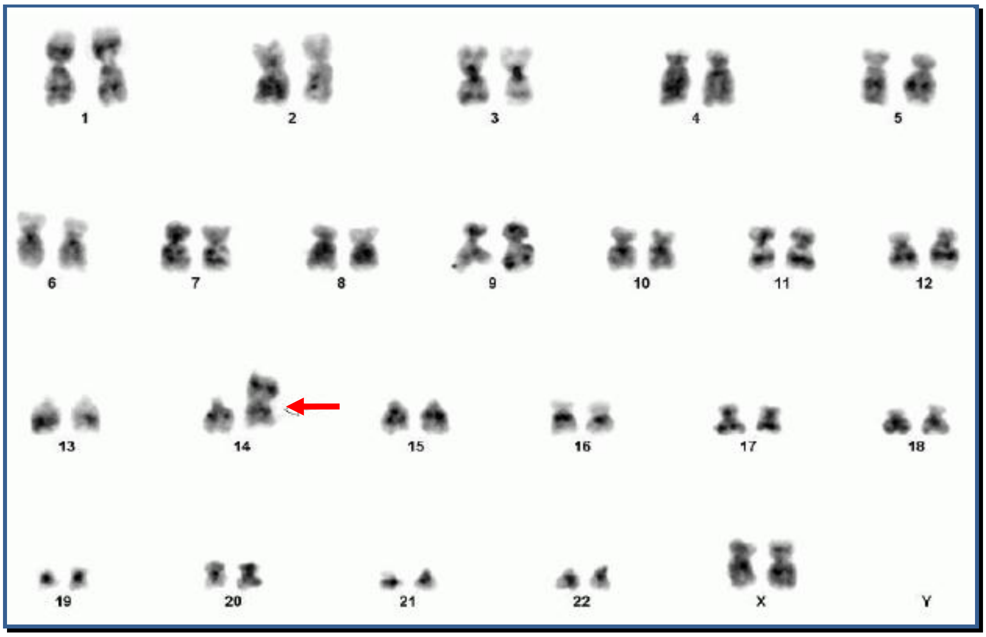


Figura 96. Cariotipo que presenta una translocación robertsoniana 13;14 no equilibrada

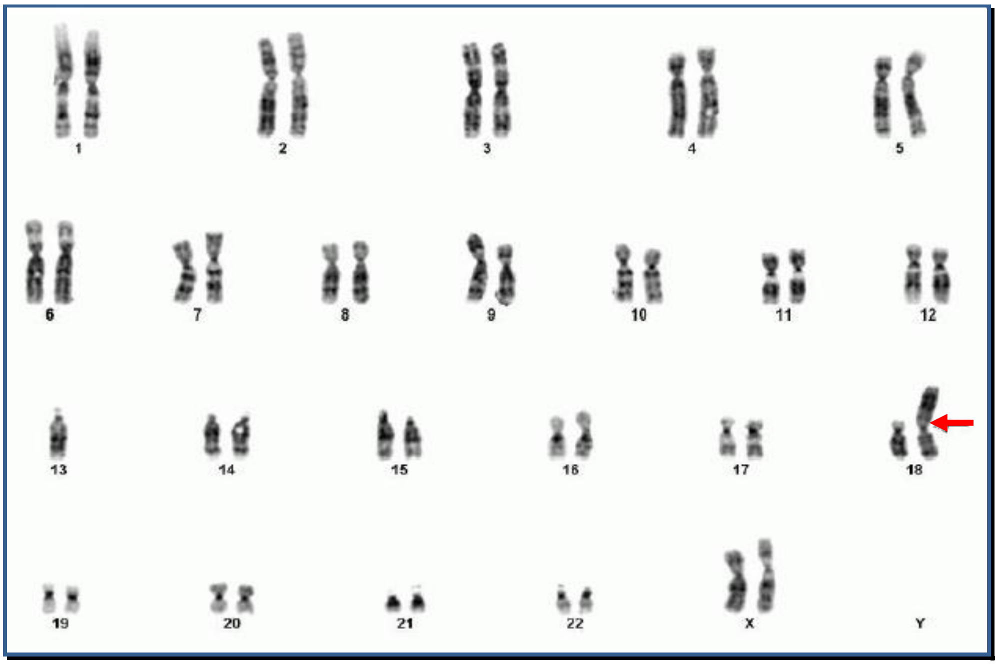


Figura 97. Cariotipo que presenta una translocación entre un cromosoma 13 y un cromosoma 18, formando un cromosoma derivativo.

4.7.4. Detección de mosaicos.

La presencia de dos líneas celulares diferentes se diagnostica normalmente mediante cariotipo. Los mosaicos encontrados en nuestras muestras prenatales se describen en la Tabla 32. Se detectaron mediante cariotipo convencional cuatro casos de mosaico de los cromosomas 21, 13, y 12 con porcentajes mayores al 30% (Tabla 33). La QF-PCR fue capaz de identificar como anormal tres de los cuatro casos de mosaicismo, no detectó un mosaico de trisomía 12 en líquido amniótico, que no presentó anomalías detectadas en ecografía. El mosaico de trisomía 12 es una aneuploidía clínicamente significativa muy estudiada en la literatura actual, con un fenotipo muy variable: retraso del desarrollo, displasia pigmentaria, defectos congénitos del corazón, microcefalia, hipotonía y retinopatía entre otras (Chen et al., 2013).

Los 4 (0,4%) casos de mosaicos cromosómico, comportaban un riesgo elevado de defectos congénitos, por tanto, finalizaron el embarazo mediante aborto espontaneo.

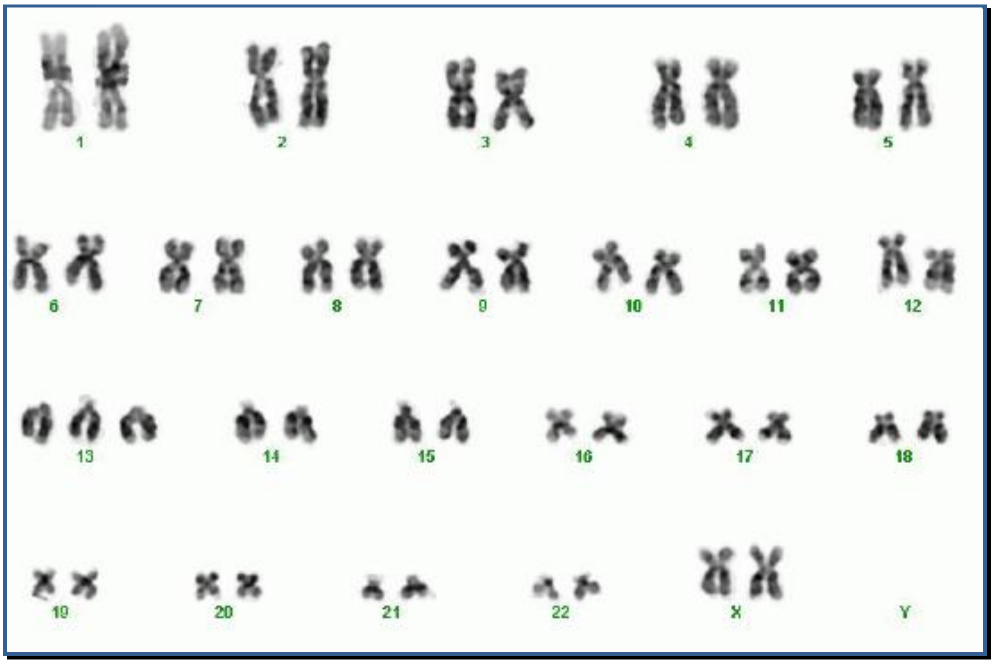
Tabla 32. Cariotipos anormales con mosaicismo cromosómico en muestras prenatales.

Cariotipo anormal	Comentario
47,XX,+13[21]/48,XX,+10,+13[6]	Cariotipo que presenta dos poblaciones celulares de sexo femenino, una de 47 cromosomas, observándose tres cromosomas 13, 21 metafases, la otra línea celular de 48 cromosomas, observándose tres cromosomas 10 y tres cromosomas 13, 6 metafases. (Figura 98).
47,XX,+21[16]/46,XX[7]	Cariotipo que presenta dos poblaciones celulares de sexo femenino, una de 46 cromosomas, sin observarse alteraciones cromosómicas valorables, 7 metafases, la otra línea celular de 47 cromosomas, observándose tres cromosomas 21, 16 metafases. (Figura 99).
47,XX,+r(21)(q22p11.2)[12]/46,XX[6]	Cariotipo que presenta dos poblaciones celulares, de sexo femenino, una de 46 cromosomas sin observarse alteraciones cromosómicas valorables, 6 metafases, la otra línea celular de 47 cromosomas, observándose un cromosoma extra posiblemente en anillo, 12 metafases.

	Efectuada técnica de FISH específica para el cromosoma 21, se observan tres copias de hibridación en mosaico. (Figura 100).
47,XY,+12[7]/46,XY[20]	Cariotipo que presenta dos poblaciones celulares de sexo masculino, una de 46 cromosomas, sin observarse alteraciones cromosómicas valorables, 20 metafases, la otra línea celular de 47 cromosomas, observándose tres cromosomas 12, en 7 metafases.

Tabla 33. Casos de mosaicismo cromosómico identificados mediante cariotipo convencional.

Cariotipo fetal	Porcentaje de células identificadas	
	Anormal	Normal
47,XX,+13[21]/48,XX,+10,+13[6]	78%	22%
47,XX,+21[16]/46,XX[7]	69.6%	30.4%
47,XX,+r(21)(q22p11.2)[12]/46,XX[6]	66.7%	33.3%
47,XY,+12[7]/46,XY[20]	26%	74%



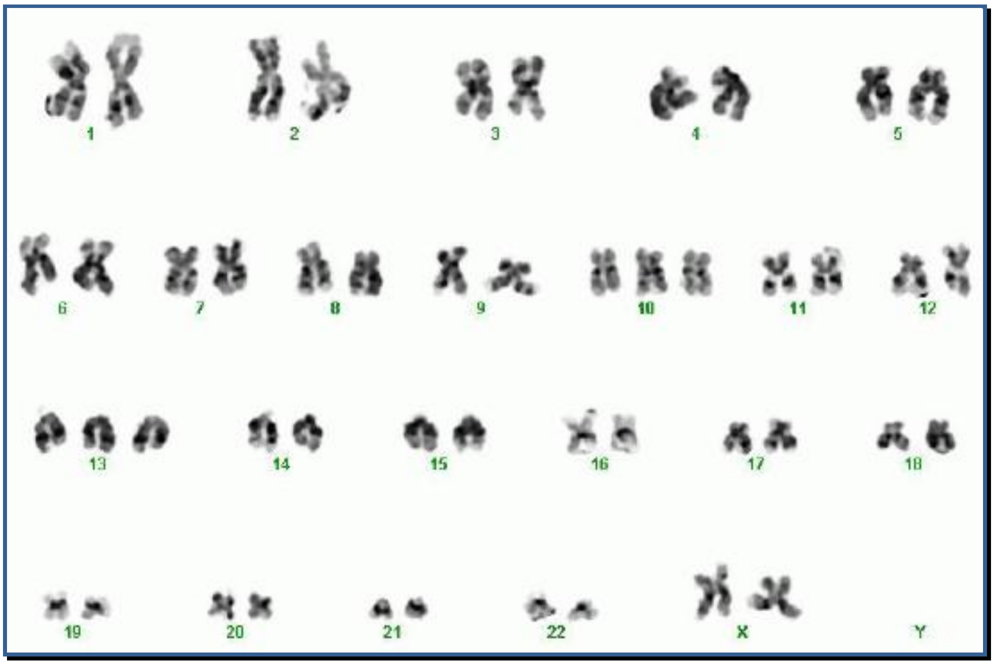
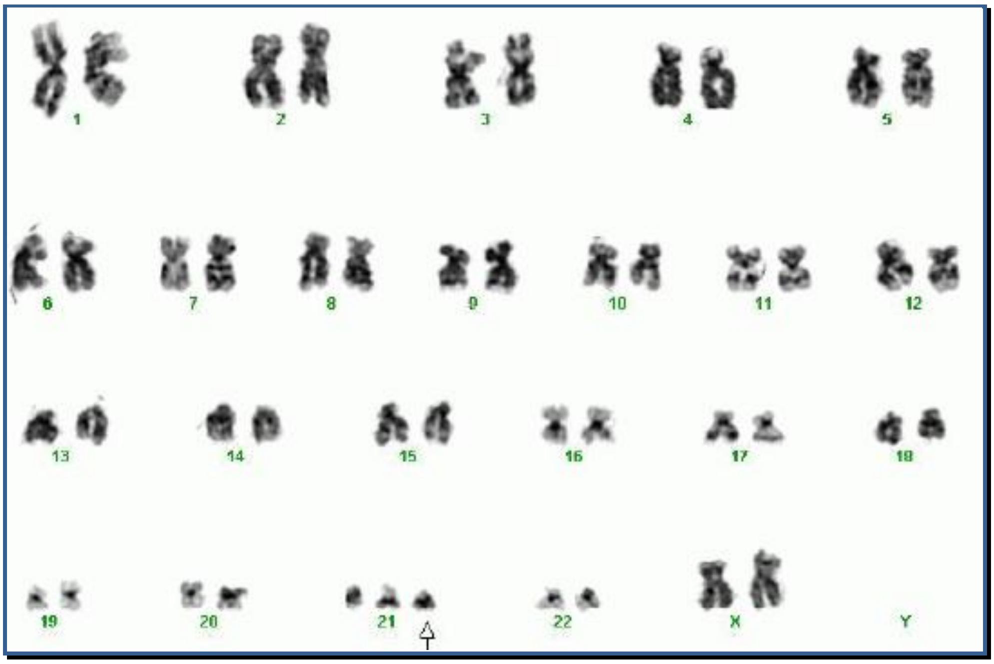


Figura 98. Cariotipo que presenta dos poblaciones de células diferentes.



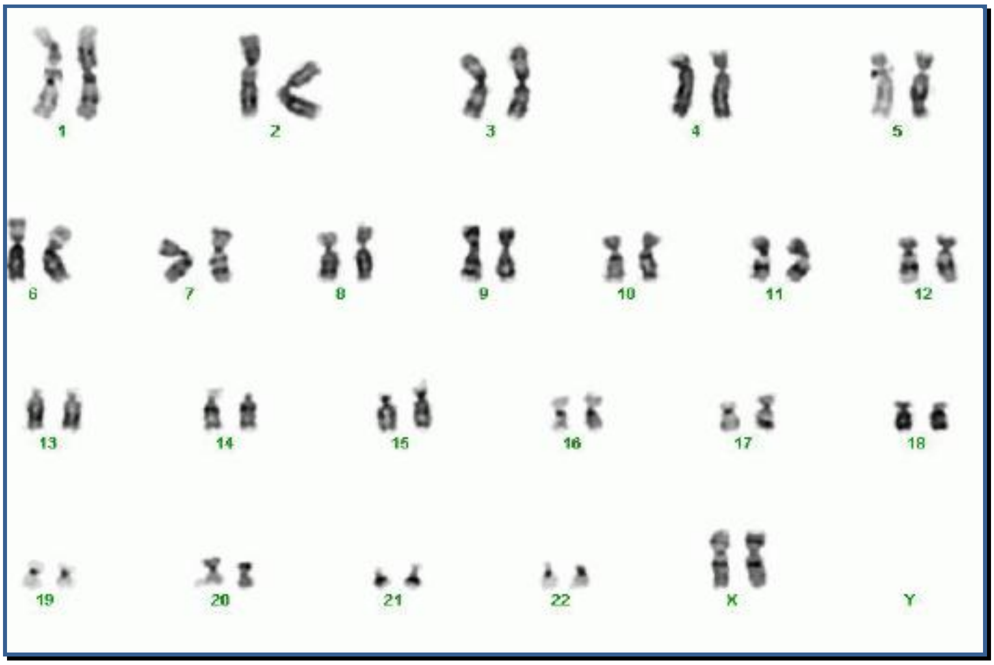


Figura 99. Cariotipo que presenta dos poblaciones de células diferentes.

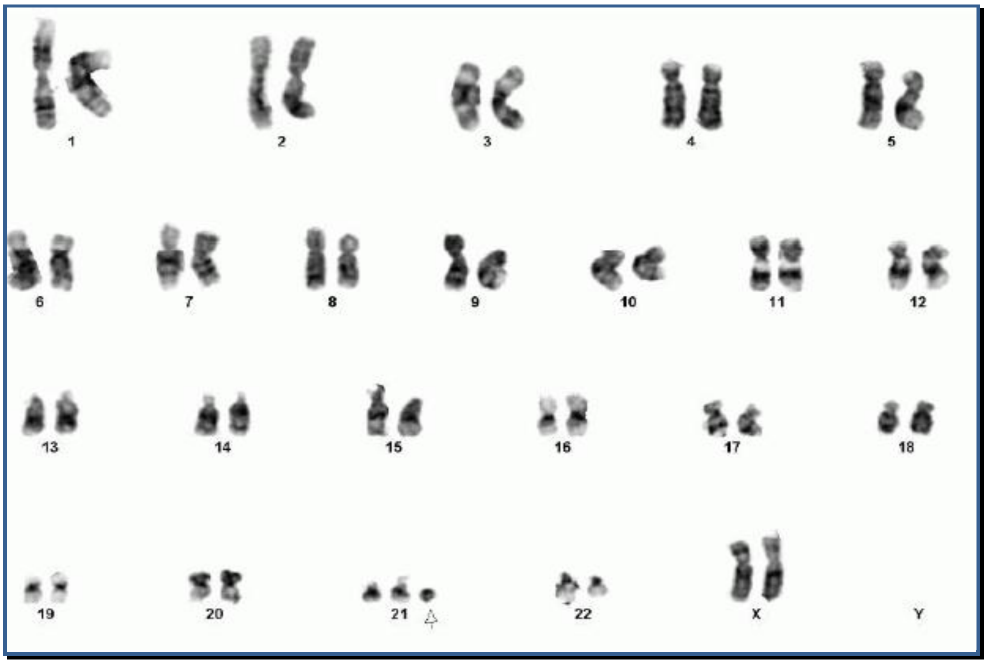


Figura 100. Cariotipo que presenta dos poblaciones de células diferentes.

Se observó una discordancia entre ambas técnicas, en un caso diagnosticado por QF-PCR como normal y anormal por cariotipo. El cariotipo identificó una muestra de vellosidad corial como mosaico de trisomía 2 (47,XY,+2[34]/46,XY[34]). Se sospechó de una posible contaminación materna de la muestra y para confirmar el diagnóstico se realizó de nuevo el cariotipo a una muestra de líquido amniótico, finalmente el resultado

obtenido en esta muestra fue normal en las 20 metafases estudiadas. El embarazo cursó con normalidad y el bebé nació sin ninguna consecuencia fenotípica.

La Tabla 34 resume los casos de anomalías cromosómicas detectadas mediante cariotipo y QF-PCR. Se han clasificado según su relevancia clínica en dos grupos: anomalías que presentan un riesgo bajo y anomalías que presentan un riesgo elevado o incierto. Se especifica el resultado postnatal de cada una de ellas.

Tabla 34: Clasificación de las anomalías cromosómicas detectadas por cariotipo convencional según su relevancia clínica y detección por la QF-PCR.

Cariotipo fetal	Comentario	Anomalías detectadas por QF-PCR	Resultado
SIN RELEVANCIA/BAJO RIESGO			
46,XY,t(4;22)(q33;q13.1)	Translocacion aparentemente equilibrada 4;22	NO	Por ecografía en el primer trimestre de gestación se observa regurgitación tricuspídea. Nace por cesárea a la 39+6 semanas de gestación. El peso es 3450gr. Su fenotipo es una niña normal
46,XY,t(17;19) (q21.1;p13.3)	Translocacion aparentemente equilibrada 17;19	NO	Por ecografía en el primer trimestre de gestación se observa una TN elevada (3.3mm). Nace a las 40 semanas de gestación. El peso es 3690gr. Su fenotipo es un niño normal
46,XY,t(17;19)(q21.1;p13.3)	Translocacion aparentemente equilibrada 17;19	NO	Por ecografía en el primer trimestre no presenta hallazgos de cromosomopatía. Presenta la PAPP-A baja (0.34 MoM). Nace a la 39+1 semanas de gestación. El peso es 3410gr. Su fenotipo es un niño normal
46,XY,inv(9)(phqh)	Inversión pericéntrica en un cromosoma 9	NO	Por ecografía en el primer trimestre de gestación se observa una TN elevada (4.5mm). Nace a las 40 semanas de gestación. El peso es 3450gr. Su fenotipo es un niño normal
46,XX,inv(9)(phqh)	Inversión pericéntrica en un cromosoma 9	NO	Por ecografía en el primer trimestre de gestación se observa ligera incurvación con respecto a los huesos largos. Nace a las 40 semanas de gestación. El peso es 3450gr. Su fenotipo es una niña normal

45,XX,der(13;14)(q10;q10)	Translocación robertsoniana 13;14	NO	Por ecografía en el primer trimestre no presenta hallazgos de cromosomopatía. Nace a las 38 semanas de gestación. El peso es 2800 gr. Su fenotipo es una niña normal
45,XY,der(13;14)(q10;q10)	Translocación robertsoniana 13;14	NO	Por ecografía en el primer trimestre no presenta hallazgos de cromosomopatía. Nace a las 38+4 semanas de gestación. El peso es 3150gr. Su fenotipo es un niño normal
46,X,Yqs	Cromosoma satelitar	NO	Por ecografía en el primer trimestre no presenta hallazgos de cromosomopatía Nace a las 39 semanas de gestación. El peso es 3500gr. Su fenotipo es un niño normal
45,XY,der(14;21)(q10;q10)	Translocación robertsoniana, 14;21	NO	Por ecografía en el primer trimestre de gestación se observa una TN elevada (3.3). Nace a las 40 semanas de gestación. El peso es 3690gr. Su fenotipo es un niño normal
RIESGO ELEVADO O INCIERTO			
46,XY,der(14;21)(q10;q10),+21	Trisomía 21 por translocación robertsoniana 14;21	SI	Por ecografía en el primer trimestre de gestación se observa TN aumenta (4.1 mm). PAPP-A baja (0.17 MoM). IVE
46,XX,+13,der(13;14)(q10;q10)	Trisomía 13 por translocación robertsoniana 13;14	SI	IVE
45,XX,der(13;18)(?;?),-18	Translocacion 13;18	NO	IVE
MOSAICOS			
47,XX,+13[21]/48,XX,+10,+13[6]	Trisomía 13 en mosaico	SI	Por ecografía en el primer trimestre de gestación se observa ductus venoso anormal y quiste en fosa posterior.

			PAPP-A baja (0.26 MoM). IVE
47,XX,+21[16]/46,XX[7]	Trisomía 21 en mosaico	SI	Por ecografía en el primer trimestre de gestación se observa TN aumenta (3.8 mm). PAPP-A baja (0.15 MoM). IVE
47,XX,+r(21)(q22p11.2)[12]/46,XX[6]	Trisomía 21 en mosaico. Cromosoma extra posiblemente en anillo	SI	Por ecografía en el primer trimestre de gestación se observa TN aumenta (3.5 mm). IVE
47,XY,+12[7]/46,XY[20]	Trisomía 12 en mosaico	NO	Por ecografía en el primer trimestre no presenta hallazgos de cromosomopatía. IVE
OTRAS ANEUPLOIDÍAS			
47,XY,+9	Trisomía 9	NO	Por ecografía en el primer trimestre de gestación se observa HN ausente. Aborto espontaneo
47,XX,+2	Trisomía 2	NO	Por ecografía en el primer trimestre de gestación se observa TN aumenta (5.2 mm), exomphalos con contenido intestinal y hepático, y corazón desplazado caudalmente. Muerte fetal.
47,XXY	Klinefelter	SI	Por ecografía en el primer trimestre de gestación se observa TN aumenta (5 mm). IVE
69,XXX	Triploidía	SI	Por ecografía en el primer trimestre de gestación se observa características propias de feto triploide. Aborto espontáneo

4.8. ESTUDIO DEL CARIOTIPO PATERNO Y MATERNO.

Cuando se encuentra alguna anomalía en el feto por translocación heredada, la pareja debe acudir tempranamente a la consulta de Asesoramiento Genético para realizarse estudios cromosómicos con el objetivo de determinar si son portadores, y poder tomar las decisiones que ellos crean necesarias. En el consejo genético se debe de examinar a los padres, y hermanos del progenitor portador de la translocación, que aunque fenotípicamente son normales puede ser portadores de la translocación equilibrada y por tanto presentar un riesgo de engendrar hijos trisómicos.

En la tabla 35 se muestra el estudio de los cromosomas de los padres mediante la técnica de cariotipo convencional, que se realizó a las parejas que presentaron un feto afecto de una anomalía estructural equilibrada y/o no equilibrada.

Tabla 35. Estudio de los cromosomas de los padres mediante cariotipo.

Cariotipo Fetal	Padre	Madre
46,XY,t(4;22)(q33;q13.1)	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo
46,XY,t(17;19) (q21.1;p13.3)	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo
46,XY,t(17;19)(q21.1;p13.3)	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo
46,XY,inv(9)(phqh)	Portador del reordenamiento equilibrado[a]	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo
46,XX,inv(9)(phqh)	Portador del reordenamiento equilibrado[a]	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo
45,XX,der(13;14)(q10;q10)	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo
45,XY,der(13;14)(q10;q10)	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo

46,X,Yqs	Padre portador del cromosoma Y satélite (46 X, Yqs+)	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo
45,XY,der(14;21)(q10;q10)	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo	Portadora de la Translocación robertsoniana[b]
46,XY,der(14;21)(q10;q10),+21	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo
46,XX,+13,der(13;14)(q10;q10)	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo
45,XX,der(13;18)(?;?),-18	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo	46,XX (38),48,XXX (1),45,X(1) clínicamente significativa[c]
47,XX,t(2;5)(p21;p13.3),+21	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo	No evidencia ninguna anomalía estructural ni numérica. Anomalía de novo
47,XX,+13[21]/48,XX,+10,+13[6]	No evidencian ninguna anomalía estructural ni numérica.	No evidencian ninguna anomalía estructural ni numérica.
47,XX,+21[16]/46,XX[7]	No evidencian ninguna anomalía estructural ni numérica.	No evidencian ninguna anomalía estructural ni numérica.
47,XX,+r(21)(q22p11.2)[12]/46,XX[6]	No evidencian ninguna anomalía estructural ni numérica.	No evidencian ninguna anomalía estructural ni numérica.
47,XY,+12[7]/46,XY[20]	No evidencian ninguna anomalía estructural ni numérica.	No evidencian ninguna anomalía estructural ni numérica.

[a]Del estudio del cariotipo de la pareja se desprende que es el padre el portador del reordenamiento equilibrado y el transmisor de esta característica a su hijo. Se trata de la inversión que con más frecuencia se observa en cromosomas humanos. Se estima que está presente en el 1% de todos los individuos a los que se les hace un cariotipo. No se considera que produzca efectos deletéreos en portadores y no parece estar asociada con un riesgo significativo de aborto espontáneo o descendencia desequilibrada. Por

tanto, suele ser considerado como una variante normal. El riesgo de asociarse con una anomalía congénita es asimilable al de la población general estimado entre 1-3%.

[b]El padre presenta un cariotipo normal. El feto ha heredado la translocación que porta la madre. En general los portadores de translocaciones robertsonianas equilibradas suelen ser asintomáticos.

[c]De las 40 metafases analizadas 38 de ellas (95%) son 46,XX correspondientes a una fórmula de mujer cromosómicamente normal, una metafase (2.5%) ha dado 48,XXXX y en otra metafase (2.5%) se he encontrado una fórmula 45,X.

Las células 45,X se corresponden con una monosomía X o Síndrome de Turner en mosaico. Al tratarse de una forma en mosaico con una baja frecuencia <10% la expresión es variable e impredecible. Con una alta probabilidad se trata de una variante de la normalidad con escasa o nula significación clínica. Se asume que de manifestarse alguna alteración debe ser menos extensa que en la forma completa en la que todas las células tienen dotación génica alterada (45,X).

La posibilidad de que su línea germinal se encuentre afectada hay que tenerla presente. Seguramente sus gametos estén parcialmente alterados ocasionando ciclos ováricos improductivos en número indeterminado. La monosomía X hace prácticamente inviable el desarrollo del embrión en etapas muy tempranas de su desarrollo ocasionando aborto precoz.

4.9. QF-PCR VERSUS CARIOTIPO CONVENCIONAL EN EL DIAGNÓSTICO PRENATAL DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS.

De las 905 muestras prenatales diagnosticas mediante el cariotipo convencional un total de 108 muestras presentaron un resultado anormal. Atendiendo a la importancia clínica de estas anomalías cromosómicas (Tabla 36), 99 de los 108 casos presentaron un riesgo elevado o incierto de resultado clínicamente adverso y 9 casos presentaron un riesgo bajo. De las 99 anomalías cromosómicas clínicamente significativas detectadas por cariotipo, 95 (96%) fueron detectadas como anormales por la QF-PCR, pero 4 (4%) no fueron detectadas (Tabla 36).

Tabla 36. Defectos cromosómicos detectados por el análisis del cariotipo y QF-PCR clasificado de acuerdo a su resultado adverso.

Análisis citogenético (n=108)	**Cariotipo anormal**	**QF-PCR anormal**
No riesgo o bajo riesgo de resultado adverso	**9**	
Estructuras balanceadas	9	-
Total	**9**	**0**
Alto riesgo de resultado adverso	**99**	
Cariotipos anormales detectados por QF-PCR		**95 (96%)**
Trisomía 21	58	58
Trisomía 18	15	15
Trisomía 13	7	7
Turner	6	6
Klinefelter	1	1
Triploidía	3	3
Mosaico trisomía 21	2	2
Mosaico trisomía 13	1	1
Estructuras no balanceadas (21,13)	2	2
Total	**95**	**95**
Cariotipos anormales no detectados por QF-PCR		**4 (4%)**
Trisomía 9	1	-
Trisomía 2	1	-
Estructuras no balanceadas	1	-
Mosaico trisomía 12	1	-
Total	**4**	**0**

En la tabla 37 se muestran los resultados de un análisis retrospectivo de detección de anomalías cromosómicas combinando QF-PCR con o sin cariotipo en distintos supuestos y el análisis de costes que cada una de estas políticas supondría se muestran en la tabla 37.

Si se realizara QF-PCR a todas las muestras prenatales y se complementara el estudio con cariotipo solo en los casos con una TN≥4.5 mm, detectaríamos 96 (97%) de las 99 anomalías cromosómicas clínicamente significativas. Con esta política se realizarían ambas técnicas en 47 (5%) de las 928 muestras prenatales, sin embargo, no serían detectados 3 (3%) casos de anomalías clínicamente importantes (Tabla 37), dos

de estas anomalías, están asociadas a anomalías ecográficas y/o anomalías cromosómicas incompatibles con la vida (Tabla 38).

Según el análisis de nuestros resultados, si realizados el cariotipo a los casos que presenten una TN≥4.5 y además a los casos con alteraciones ecográficas, se detectarían 98 de las 99 anomalías cromosómicas clínicamente significativas, que representan el 99% de las muestras analizadas con anomalías clínicamente significativas, aumentando la sensibilidad en la detección. Con este enfoque se hubiesen realizado ambas técnicas en 118 (12.7%) muestras prenatales y no se detectarían un 0.1% de las 928 muestras analizadas. El resumen del coste estimado de cada política de diagnóstico para la detección de las anomalías cromosómicas mediante la técnica QF-PCR y cariotipo convencional se detallan en la tabla 37. Mediante esta política restrictiva de realizar cariotipo solo en los casos que presenten alteraciones anormales detectadas en ecografía y/o una TN≥4.5, se ahorraría en los costes de las pruebas diagnósticas QF-PCR y cariotipo un 54%, sin repercutir en la pérdida de la productividad/efectividad de la prueba.

Tabla 37. Política de cariotipo completo versus QF-PCR cómo técnica única en casos de alto riesgo de resultado adverso

Política de cariotipo a todas las muestras	Necesidad de cariotipo	Anomalías de alto riesgo detectadas	Anomalías de alto riesgo no detectadas	Costes (€)
QF-PCR más Cariotipo realizado en todos los casos	928 (100%)	99 (100%)	0	145.566
QF-PCR técnica única	-	95 (96%)	4 (4%)	54.622
QF-PCR más Cariotipo realizado solo en casos con aumento de la TN				
≥2.5 mm	232 (25%)	97 (98%)	2(2%)	
≥3 mm	160 (17.2%)	96 (97%)	3(3%)	
≥3.5 mm	116 (12.5%)	96 (97%)	3(3%)	
≥4.0 mm	65 (7%)	96 (97%)	3(3%)	
≥4.5 mm	47 (5%)	96 (97%)	3(3%)	59.664
≥5.5 mm	27 (3%)	95 (96%)	4 (4%)	
≥6.5 mm	15 (1.6%)	95 (96%)	4 (4%)	
QF-PCR más Cariotipo realizado en casos con NT≥4.5mm y otros hallazgos ecográficos anormales*				
	118 (12.7%)	98 (99%)	1 (1%)	66.546

* Hueso nasal, regurgitación tricuspidea, ductus venoso, micrognatia, defecto cardíaco, riñones displásicos, ventrículomegalia, hidronefrosis, foco ecogénico cardiaco, intestino ecogénico, hidropesía fetal.

Tabla 38. Información clínica detallada sobre aneuploidías cromosómicas significativas no detectados por QFPCR con NT≤4.5

Cariotipo	Muestra	Hallazgos ecográficos	Resultado
47,XY,+9	VC	Restricción del crecimiento, ventriculomegalia, defectos cardiacos, micrognatia	IVE
45,XX,der(13;18)(?;?),-18	VC	Ventriculomegalia, hidronefrosis	Muerte fetal
47,XY,+12[7]/46,XY[20]	LA	Normal: sin defectos*	IVE

Abreviaturas: IVE= Intervención voluntaria del embarazo

* PAPP-A baja

4.10. RESULTADOS OBSTÉTRICOS DE LAS PACIENTES QUE SE HAN SOMETIDO A UNA PRUEBA INVASIVA.

En cuanto a los resultados obstétricos, durante el periodo 2009-2012 se realizaron 85 interrupciones voluntarias del embarazo debido a anomalías cromosómicas o anormalidades anatómicas en el feto. Un total de 11 gestantes tuvieron un aborto espontáneo, como consecuencia de anomalías cromosómicas y/o causas desconocidas, aunque la mayor tasa en productos de abortos espontáneos en nuestra serie fueron fetos aneuploídes. Existen 4 casos de nacidos vivos con Síndrome de Down, un caso fue diagnosticado mediante la QF-PCR y confirmado por cariotipo, pero los padres decidieron continuar con el embarazo, otro caso de nacido con Síndrome de Down fue un falso negativo (cribado de primer trimestre de bajo riesgo), y como consecuencia la gestante no se realizó una prueba invasiva, y finalmente dos casos de nacidos con esta anomalía, fueron debidos a que las pacientes por decisión propia no se realizaron la técnica invasiva.

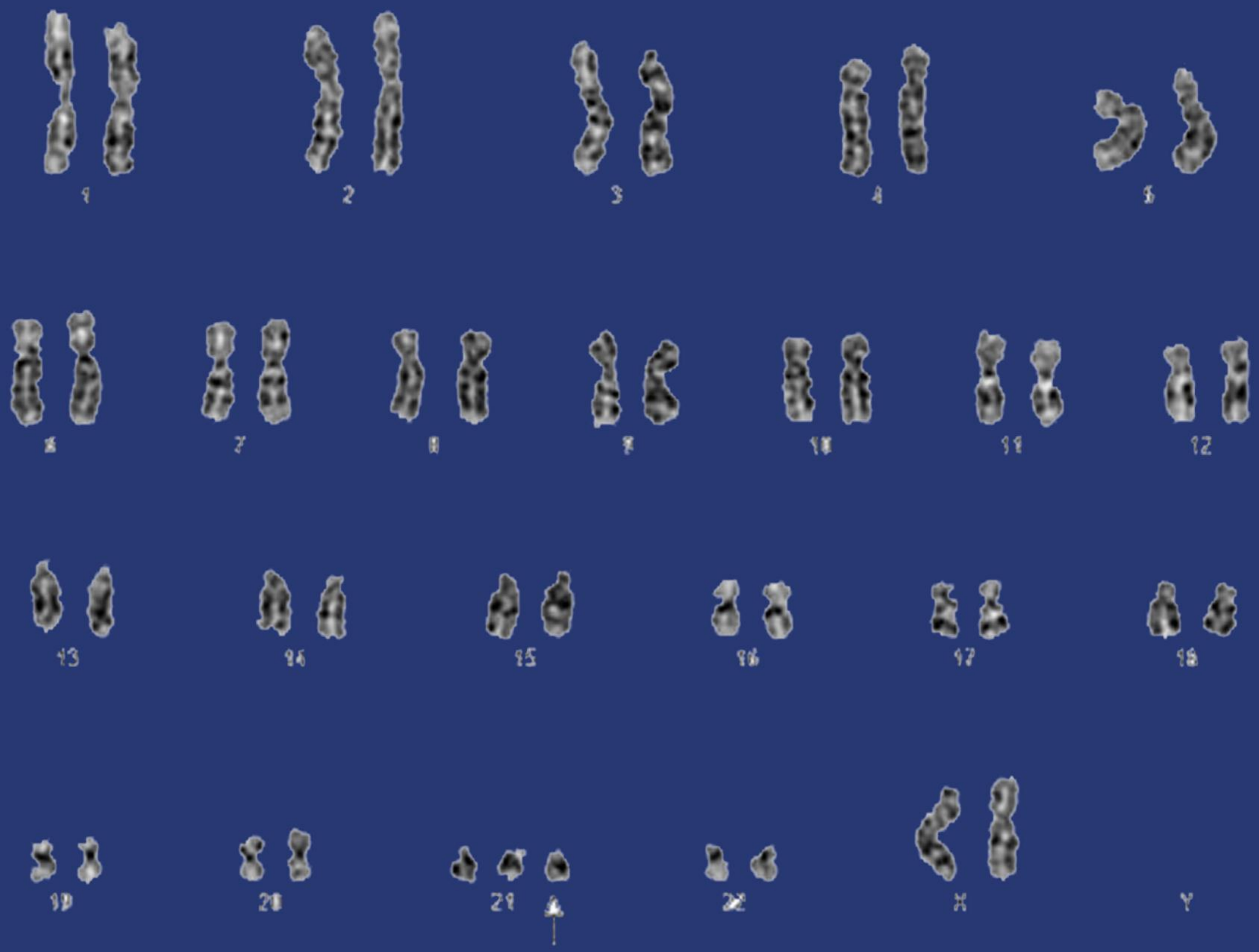
Teniendo en cuenta el número de anomalías cromosómicas detectadas por el cariotipo convencional (108), la siguiente tabla muestra los resultados obstétricos:

Tabla 39. Resultados obstétricos de las anomalías cromosómicas más comunes.

Anomalía cromosómica	IVE	Nacido vivo	Otro Resultado (muerte, aborto)	Resultado Desconocido	Total
Trisomía 21	52(89.6%)	4	2 (3.4%)	-	58
Trisomía 18	12 (80%)	-	3 (6.7%)	-	15
Trisomía 13	5 (71.4%)	-	2(28.6%)	-	7
Síndrome de Turner	4 (66.7%)	-	2(33.4%)	-	6
Síndrome Klinefelter	1 (100%)	-	-	-	1
Triploidía	2 (66.7%)	-	1(33.3%)	-	3
Total	76	4	10	-	90

Tabla 40. Resultados obstétricos otras anomalías cromosómicas.

Anomalía cromosómica	IVE	Nacido vivo sin anomalía	Otro Resultado (muerte, aborto)	Resultado Desconocido	Total
Translocaciones balanceadas	-	9 (100%)	-	-	9
Translocaciones no balanceadas	4 (100%)	-	-	-	3
Otras anomalías autosómicas	1 (50%)	-	1(50%)	-	2
Mosaicos	4 (100%)	-	-	-	4
Total	9	9	1	-	18



5.DISCUSIÓN

En la actualidad, en la mayoría de los hospitales se realiza el cribado combinado del primer trimestre para la detección de anomalías cromosómicas y de malformaciones congénitas que se asocian en su mayoría a alteraciones cromosómicas fetales. Sin embargo, en España no existe una política uniforme para este método de cribado de anomalías cromosómicas, ya que existe una gran diversidad de estrategias respecto a lo que se aplica en los distintos centros. En nuestro centro, el cribado combinado del primer trimestre consiste en utilizar la edad materna avanza, el espesor de la TN, los marcadores ecográficos secundarios y los marcadores bioquímicos para la detección de anomalías cromosómicas. Este cribado es muy importante realizarlo precozmente para detectar tempranamente los casos anormales y disminuir la morbimortalidad de dichas patologías, así como para poder identificar precozmente a aquellas madres que presenten una probabilidad elevada de padecer alguna anomalía y poder realizar un examen genético a través de un diagnóstico invasivo. En el cribado del primer trimestre, la detección del síndrome de Down ha sido uno de los objetivos prioritarios por ser la aneuploidía más frecuente en nacidos vivos y la causa más común de retraso mental severo.

La ecografía de primer trimestre tiene un papel de gran importancia, ya que la translucencia nucal es el marcador ecográfico más sensible en la estimación del riesgo del síndrome de Down. Además de la TN la integración de los marcadores ecográficos secundarios (HN y RT y DV), mejora las tasas de detección, disminuyendo la tasa de falsos positivos.

Los resultados de nuestro estudio retrospectivo para el screening combinado del primer trimestre para la detección de anomalías cromosómicas presenta una tasa de detección del 95.75% con una tasa de falsos positivos del 3.7%, estableciendo como punto de corte 1/270, datos que concuerdan con los resultados publicados en la literatura (Malone et al., 2005; Nicolaides et al., 2005; Kagan et al., 2010; Wright et al., 2010; Stressing et al., 2011; Ghaffari et al., 2012; Karadzov-Orlic et al., 2012; Torella et al., 2013). La incorporación de los nuevos marcadores ecográficos secundarios en la práctica clínica, ha aumentado la detección de casos con anomalías evitando así la realización de procedimientos invasivos innecesarios (biopsia corial y/o amniocentesis) en un 30%, sin comprometer la capacidad de detección (Molina García et al., 2010). Estos procedimientos invasivos, conllevan también ciertos riesgos, entre ellos el riesgo

de pérdida fetal (con cariotipo normal). Esto justifica la necesidad de ajustar al máximo las indicaciones para la realización de pruebas invasivas, evitando la realización de un número importante de estas.

En un estudio de gestantes con un riesgo intermedio (1/101-1/1.000), Nicolaides y colaboradores (2005), estimaron la tasa de detección de los marcadores ecográficos secundarios (hueso nasal, flujo en el ductus venoso y regurgitación tricuspidea) en el primer trimestre, concluyendo que estos marcadores, podrían mejorar las tasas de detección en más del 90% de los fetos con trisomía 21, con una tasa de falsos positivos del 2-3%.

Nuestro trabajo se ha llevado a cabo realizando el cribado combinado en el primer trimestre de gestación según las recomendaciones de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO). La edad gestacional media en la que hemos realizado el cribado combinado ha sido de 12 semanas, ya que distintos autores argumentan que los marcadores ecográficos tienen mejor capacidad predictiva para la trisomía 21 cuando la detección se lleva a cabo durante este periodo (Kagan et al., 2008; Maiz et al., 2009; Nicolaides, 2011; Karadzov-Orlic et al., 2012). Una ventaja del cribado del primer trimestre es la determinación precoz del riesgo ya que nos permite anticipar la realización de técnicas invasivas como la biopsia de vellosidad corial, acelerando la obtención de información diagnóstica, con lo que, el tiempo de ansiedad de la madre se reduce y en caso que fuera necesario se adelanta el proceso de interrupción voluntaria del embarazo.

En la evaluación del riesgo de anomalías cromosómicas llevado a cabo en el primer trimestre, en nuestra muestra de estudio no solo se han detectado los casos con trisomía 21, sino también otras anomalías, tales como la trisomía 18, la trisomía 13, y las anomalías de los cromosomas sexuales. La detección de estas aneuploidías, frecuentemente se asocian a hallazgos ecográficos anormales que permiten establecer la sospecha diagnóstica con facilidad, lo que sugiere que nuestro método de cribado también es aplicable para la detección de estas anomalías, tal y como lo argumentan otros autores (Karadzov-Orlic et al., 2012).

Referente a las características demográficas de nuestra población de estudio la edad media es de 35 años de edad, el aumento progresivo en la edad de la población gestante genera un incremento notable en el número de procedimientos invasivos, aunque ciertamente se sabe que el riesgo de anomalías cromosómicas aumenta con la edad materna, también se sabe que se modifica sustancialmente con los marcadores bioquímicos y los hallazgos ecográficos, por ello es importante que el especialista explique detalladamente la importancia de considerar la asociación de los distintos marcadores y no tener solo en cuenta la edad a la hora de decidir la indicación de una prueba invasiva, gracias a esto se ha conseguido reducir el número de madres que solicitan la prueba, aun así, existe un porcentaje de madres que exigen la prueba por miedo a su edad asumiendo los riesgos que conllevan estas técnicas. Debido a ello en nuestro estudio existe un porcentaje de madres que aun explicándoles que presentan un riesgo bajo de padecer alguna anomalía cromosómica deciden realizarse la prueba comprometiendo la capacidad de detección de aneuploidías en nuestro estudio. La tendencia en nuestro hospital ha sido la de abandonar el criterio de la edad materna avanzada y la de priorizar la evaluación rigurosa de la ecografía para decidir si se realiza una prueba invasiva. Nuestra población tiene un porcentaje significativo de pacientes de raza blanca y en general, las gestantes tienen un peso dentro de la normalidad.

Se ha obtenido un porcentaje aceptable de pruebas invasivas (5.7%), este porcentaje es más elevado de lo esperado, debido a que parte de las pacientes han decido practicarse la prueba por iniciativa propia, aun no existiendo un riesgo elevado en el cribado combinado de anomalías cromosómicas. En nuestra muestra de estudio también tenemos el caso de pacientes que presentaron un cribado de alto riesgo y decidieron no realizarse la prueba invasiva, por distintas razones: motivos religiosos, miedo a pérdida fetal por el riesgo que conlleva la prueba y por no importarles el resultado pese a poder presentar alguna anomalía cromosómica.

5.1. COMPORTAMIENTO DE LA MEDIDA DE LA TRANSLUCENCIA NUCAL

La evaluación de la TN es el marcador ecográfico más sensible y efectivo en el cribado de las principales anomalías cromosómicas (trisomía 21, 18, 13 y monosomía del cromosoma X), por ello se debe realizar a todas las pacientes siempre que sea posible. El aumento de la TN fetal se asocia con la trisomía 21 y otras anomalías cromosómicas, así como de muchas malformaciones fetales y de síndromes genéticos (Salman Guraya, 2013; Goldstein et al., 2014). En fetos sanos, el grosor de la TN aumenta a medida que se incrementa la LCC fetal. El aumento de la TN se define como un valor superior al percentil 95 (2.5 mm) de la normalidad (Nicolaides, 2004; Wright et al., 2009; Tahmasebpour et al., 2012).

Según nuestros resultados hay una clara diferencia entre la mediana de la TN de fetos euploides y fetos aneuploídes, estando aumentada en estos últimos (3.5 mm). Algunos estudios argumentan que el espesor de la TN (>2.5 mm) es el marcador más eficaz para la detección no sólo de la trisomía 21 sino también de todos los principales defectos cromosómicos (Ghaffari et al., 2012; Karadzov-Orlic et al., 2012). En nuestro estudio con un valor de TN≥2.5, se obtuvo una tasa de detección de aproximadamente el 60% para la trisomía 21, 18 y 13, con una tasa de falsos positivos del 4.8%, nuestros datos concuerdan con lo publicado por otros estudios que argumentan que la TN es capaz de identificar entre el 65-75% de los fetos con trisomía 21 y otras anomalías cromosómicas con una tasa de falsos positivos del 4-5% (Nicolaides, 2004; Kagan et al.,210; Berktold et al., 2012).

5.2. COMPORTAMIENTO DE LA MEDIDA DE LOS MARCADORES ECOGRÁFICOS SECUNDARIOS.

La evaluación de los marcadores ecográficos secundarios durante el primer trimestre puede mejorar los resultados del cribado, fundamentalmente con disminución de la tasa de falsos positivos, aunque precisan de un entrenamiento adecuado.

En el presente estudio, la hipoplasia del hueso nasal, regurgitación tricuspidea y flujo reverso del ductus se observó respectivamente en el 17.24%, 13.33% y 52.38% de

los casos con síndrome de Down. En los embarazos no afectados con alguna anomalía la ausencia o hipoplasia del hueso nasal, regurgitación tricuspidea y flujo reverso del ductus se observó respectivamente en el 0.30%, 0.75% y 0.54% de los casos. La prevalencia encontrada en nuestro estudio es mucho menor en comparación con los resultados publicados en otros estudios (Cicero et al., 2004; falcon et al., 2006; Maiz et al., 2009; Kagan et al., 2009; Kagan et al., 2010; Stressig et al., 2011; Ghaffari et al., 2012; Karadzov-Orlic et al., 2012).

Karadzov-Orlic y colaboradores (2012), en un estudio retrospectivo de 4172 mujeres embarazadas, evaluaron los marcadores ecográficos secundarios en el primer trimestre de gestación. En fetos afectos de trisomía 21, el hueso nasal presentó una tasa de detección del 65% con una tasa de falsos positivos del 3.4%, el ductus venoso del 66% para una tasa de falsos positivos del 3.1% y la regurgitación tricuspidea del 57.7% con una tasa de falsos positivos del 2.1% (Karadzov-Orlic et al., 2012).

En nuestro estudio, los resultados de los marcadores ecográficos secundarios en fetos con anomalías cromosómicas (trisomía 21, 18 y 13) indican una tendencia a la infraestimación según los datos publicados en la literatura, esto conlleva a cribados negativos. Una de las casusas de estos resultados puede ser como consecuencia del poco tiempo que disponen los ecografístas en la visita con el paciente para poder examinar con detalle cada marcador. Esta tendencia a la infraestimación ha ocurrido en otros centros según estudios publicados por Evans y colaboradores (2010), que analizaron 327 centros observando una tendencia a la infraestimación en sus valores de la TN (Evans et al., 2010). Esta infraestimación de las medidas de los marcadores puede tener un efecto negativo en la efectividad del cribado debido a que puede producir una disminución en las tasas de detección y aumentar las tasas de falsos positivos.

Hay que adoptar medidas para solucionar este problema, en este sentido se ha propuesto realizar controles de calidad del cribado prenatal de primer trimestre centrándose en el control de los marcadores bioquímicos y ecográficos. Es imprescindible optimizar la medición de la translucencia nucal. Para ello se debe proporcionar un entrenamiento adecuado a los ecografistas y adoptar una técnica estándar de medida además de auditar los resultados que permitan un control de la calidad (Snijders et al., 2002).

5.3. COMPORTAMIENTO DE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS.

En los fetos con determinadas anomalías cromosómicas (trisomía 21, 18 y 13) la concentración en suero materno de la β-hCG libre se encuentra más elevada (≥2.5 MoM), al contrario ocurre con la PAPP-A la cual se encuentra aproximadamente a la mitad (<0.45 MoM) en comparación con los valores que presentan los embarazos cromosómicamente normales (1MoM) (Ghaffari et al., 2012; Patil et al., 2014). Los marcadores bioquímicos determinan en qué medida se modifica el riesgo individual de cada paciente de presentar alguna anomalía cromosómica. Los datos de las pacientes se expresan en MoM, debido a que las concentraciones séricas varían a lo largo de la gestación (Wright et al., 2010). Una gran cantidad de factores pueden afectar a las concentraciones de dichos marcadores bioquímicos (gestación única o múltiple, diabetes, peso materno, etnia, tabaquismo y el método de concepción), por lo que en el cálculo de los MoM, estos factores se deben de tener en cuenta.

En nuestro estudio, la mediana de los MoM de los marcadores bioquímicos de las pacientes está muy próxima a 1MoM, situándose en valores aceptables que indican que las medianas utilizadas son las adecuadas para nuestra población.

Según nuestros resultados, los marcadores bioquímicos individualmente tienen una baja tasa de detección de anomalías cromosómicas, la PAPP-A presentó una tasa de detección del 77.8% y la β-hCG libre del 29.7% para el diagnóstico de la trisomía 21, por lo que no es realmente útil para el cribado individual, sino que se necesita la combinación con los marcadores ecográficos para aumentar las tasas de detección, estas conclusiones coinciden con lo publicado por otros autores (Ghaffari et al., 2012).

En conclusión, la detección precoz de anomalías cromosómicas es más eficaz cuando se lleva a cabo por una combinación de la edad materna, la TN, marcadores ecográficos secundarios y marcadores bioquímicos.

5.4. LA QF-PCR COMO TÉCNICA INDEPENDIENTE.

La QF-PCR analiza los STRs de los fragmentos de DNA obtenidos por PCR, correspondientes a los cromosomas 13, 18, 21, X e Y, los cuales son de interés de estudio en muestras de vellosidades coriónicas y líquido amniótico. En nuestro estudio la QF-PCR presentó un alto grado de concordancia con el cariotipo para esos cromosomas, detectando la mayoría de anomalías cromosómicas en muestras prenatales, nuestros resultados coinciden con otros estudios (Ogilvie et al., 2005; Chitty et al., 2006; Kagan et al, 2007; Cirigliano et al., 2009; Badenas et al., 2010; Hills et al., 2010; Mann et al., 2012), sin embargo, algunos estudios argumentan que entre el 15-30% de anomalías cromosómicas detectadas por cariotipo convencional podrían no ser detectada por la QF-PCR (Caine et al., 2005).

Por supuesto, la técnica QF-PCR no se ha creado para el diagnóstico de todos los trastornos cromosómicos tales como las anomalías cromosómicas estructurales (balanceadas o no balanceadas) y los casos de mosaicismo que no serían detectados por esta técnica. Como era de esperar, las translocaciones Robertsonianas no balanceadas que dan lugar a trisomías 21, 18 o 13, no podían distinguirse de las trisomías completas. En nuestro estudio las trisomías 21 de novo por traslocacion robertsoniana fueron identificada por la QF-PCR como una trisomía 21 completa. Los casos de mosaico fueron identificados como trisomías completas, solo un caso no fue detectado porque la proporción de células anormales fue menor del 30%.

En nuestro estudio un 12% de anomalías diagnosticadas por cariotipo no fueron detectadas por la QF-PCR y de estas, aproximadamente un 8% fueron anomalías cromosómicas estructurales que carecieron de significación patológica y en todos los casos presentaron hallazgos ecográficos anormales. En estas anomalías no diagnosticadas mediante QF-PCR posteriormente se comprobó la alteración equilibrada en los progenitores, es por eso que deben acudir tempranamente a la consulta de Asesoramiento Genético para realizarse estudios cromosómicos y así poder conocer cual o cuales fueron las causas o los factores responsables de la aparición de la anomalía en el feto, que aunque fenotípicamente pueden ser normales al ser portadores de una translocación equilibrada tienen un riesgo de engendrar hijos trisómicos. Conocer los

alelos de los progenitores y su comparación con los de la gestante permite conocer el tipo de error gametogénico o post cigótico que dio lugar a la aneuploidía.

Las translocaciones pueden ocurrir por primera vez en una familia como consecuencia de un accidente biológico en la formación de los gametos (óvulos o espermatozoides) en este caso, el riesgo de fenotipo anormal es del 5-6% (Gardner y Sutherland, 2004). En ocasiones los portadores de translocaciones balanceadas tienen antecedentes familiares de este trastorno, quizás trasmitidas de una generación a otra sin ocasionar problemas aparentes.

Cuando en una pareja, con cariotipo normal se produce el nacimiento de un hijo con trisomía 21 regular, el riesgo de recurrencia es bajo del 1-2%, pero sin duda más elevado que para otra pareja de la misma edad. En los casos de translocación de novo, con cariotipo normal de los padres obviamente, el riesgo de recurrencia de tener otro hijo con síndrome de Down por translocación de novo es muy bajo, inferior al 1%. En los casos de translocación heredada, el riesgo de recurrencia dependerá de dos factores: Tipo de translocación y quién es el portador de la translocación equilibrada.

Estudios poblacionales han demostrado que el riesgo de los portadores de una translocación robertsoniana 14;21 de presentar descendencia desequilibrada es del 10-15% si las madres son portadoras y es más reducido si el portador es el padre (inferior al 2%).

Cuando la translocación balanceada se da entre los cromosomas 21;22 y el portador es el padre, el riesgo de hijos con síndrome de Down es inferior al 2%, mientras que si esta translocación balanceada la presenta la madre el riesgo es del 33% (Romero Casanova, 2011).

En nuestro estudio no se ha podido establecer la correlación genotipo-fenotipo en las muestras que presentaron anomalías cromosómicas numéricas o estructurales no balanceadas, debido a que en la mayoría de casos la paciente abortó, bien espontáneamente o por intervención.

En nuestra experiencia, la trisomía 21 fue la alteración cromosómica más frecuente. Este dato es concordante con los disponibles en la bibliografía demostrando tanto la QF-PCR como el cariotipo ser técnicas con una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de fetos con trisomía 21, 18, 13 y aneuploidías de los cromosomas sexuales.

Hay que tener presente que la QF-PCR como técnica única presenta una serie de limitaciones, la primera es que sólo puede detectar las aneuploidías comunes (alteraciones en número de copias de los cromosomas 21, 18, 13, X, e Y), mientras que las anomalías estructurales en los cromosomas, tales como translocaciones, inversiones, cromosomas marcadores, y otros, no serían detectadas. La segunda es que algunos padres que son portadores de un reordenamiento equilibrado, pueden transmitir a su descendencia una anomalía cromosómica desequilibrada que no sería detectada por la QF-PCR (Chitty et al., 2006). Según nuestros datos la QF-PCR puede identificar un gran porcentaje de los reordenamientos desequilibradas en el curso del embarazo. Y la tercera es que la sensibilidad en la detección de la presencia de dos o más líneas celulares en casos de mosaico, depende en gran medida de las proporciones de células y del cromosoma involucrado. Los bajos niveles de mosaicismo cuando la aneuplodía está presente en menos del 15% al 20% de las células no pueden ser detectados por la QF-PCR (Donaghue et al., 2005; Cirigliano et al., 2009).

5.5. QF-PCR VERSUS CARIOTIPO CONVENCIONAL.

La técnica QF-PCR (Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction) ha demostrado ser una técnica de genética molecular rápida, eficiente y fiable para el diagnóstico de las anomalías cromosómicas más comunes en muestras prenatales en comparación con el análisis del cariotipo convencional que es una técnica compleja, con un coste elevado y el tiempo para obtener un resultado es mucho mayor, coincidiendo con lo publicado por otros autores (Badenas et al., 2010; Xu et al., 2010; Atef et al., 2011; Allingham-Hawkins et al., 2011; Mann et al., 2012; Grati et al., 2013). Desde su implantación en nuestro centro se ha planteado un cambio en la política de detección de anomalías cromosómicas donde el ―gold estándar" para el diagnóstico prenatal era el cariotipo convencional.

Los resultados de nuestro estudio muestran que en nuestro hospital un cambio en la política de diagnóstico de anomalías cromosómicas, realizando la QF-PCR como técnica exclusiva en las muestras prenatales podría detectar el 88% de todas las anomalías cromosómicas (incluyendo las anomalías clínicamente no significativas, tales como: translocaciones equilibradas y reordenamientos de novo sin pérdida de material genético), aumentando su sensibilidad en un 96% si solo consideramos las anomalías clínicamente significativas (trisomías 21, 18, 13, monosomías X, otras aneuploidías cromosómicas sexuales y autosómicas, triploidías, tetraploidias, deleciones o duplicaciones de novo, reordenamientos equilibrados de novo, translocaciones no balancedas y mosaicos) detectadas por cariotipo. Nuestros resultados concuerdan con los publicados en la literatura (Chitty et al., 2006; Cirigliano et al., 2006; Cirigliano et al., 2009; Badenas et al., 2010; Comas et al., 2010; Papoulidis et al., 2012; Škerget et al., 2013). La tasa de detección de la QF-PCR es del 100% para las aneuploidías más comunes (21, 18, 13, X e Y) que representaron el 74% de todas las anomalías detectadas mediante cariotipo, estos datos concuerdan con lo publicado en la literatura (Cirigliano et al., 2006; Cirigliano et al., 2009).

Nuestros datos difieren ligeramente del estudio realizado por Hill y colaboradores (2010), donde la QF-PCR como técnica independiente presentó una tasa de detección de anomalías cromosómicas clínicamente significativas del 99.9% (Hill et al., 2010).

Cuando se realizó el cariotipo al 13% de las 928 muestras que presentaron hallazgos ecográficos anormales y/o una TN≥4.5 mm, la de detección de anomalías cromosómicas clínicamente significativas aumentó en un 99%. Utilizando esta misma estrategia Chitty y colaboradores (2006) detectaron el 99% de anomalías cromosómicas clínicamente significativas, realizando el cariotipo en aproximadamente el 10% de las pacientes. Estos autores argumentan que en fetos con una TN<4 mm evaluada en el primer trimestre de gestación, existe una menor prevalencia de que presenten cariotipos anormales (Chitty et al., 2006).

Si para el diagnóstico de aneuploidías se utilizara la QF-PCR como técnica exclusiva y el cariotipo solo bajo determinadas indicaciones, el coste económico sería de 66546 € en vez de 145566 € que costaría si realizáramos el cariotipo a las 928

pacientes, lo que supondría un ahorro sustancial del 54%, coincidiendo con lo publicado por otros autores (Chitty et al., 2006; Comas et al., 2010; Hills et al., 2010; Gekas et al., 2011; Speevak et al., 2011; Škerget et al., 2013) (Tabla 37).

Muchos estudios retrospectivos de evaluación del efecto clínico de la sustitución del cariotipo convencional por técnicas de genética molecular en muestras prenatales han sido ampliamente estudiados, pero los resultados han sido contradictorios (Caine et al., 2005; chitty et al., 2006; Kagan et al., 2007; Leung et al., 2008; Putzova et al., 2008; Cirigliano et al., 2009; Ogilvie et al., 2009; Hills et al., 2010; Comas et al., 2010; Speevak et al., 2011; Gekas et al., 2011; Papoulidis et al., 2012), debido a que la sustitución del cariotipo podría tener consecuencias importantes, tales como la posibilidad de que algunos nacidos vivos puedan estar afectados por defectos evitables (Nicolini et al., 2004; Caine et al., 2005; Ogilvie et al., 2005; Ogilvie et al., 2009).

De acuerdo con nuestros resultados, si se estableciera en nuestro hospital esta nueva política de diagnóstico, no se hubiese identificado solo un caso de trisomía 12 en mosaico, que es una aneuploidía clínicamente significativa, muy estudiada en la literatura actual y compatible con la vida, pero que se asocia con un mal pronóstico para el recién nacido. Presenta un fenotipo muy variable, incluyendo retraso en el desarrollo, displasia pigmentaria, defectos congénitos del corazón, microcefalia, hipotonía y retinopatía, entre otros (Chen et al., 2013). La necropsia de este caso, no se llevó a cabo después de la interrupción del embarazo debido a que la madre no dio su consentimiento. Esta anomalía fue detectada por cariotipo, pero según la nueva política de sustitución del cariotipo, este procedimiento no se habría realizado porque la paciente no presentó hallazgos ecográficos anormales. Este caso representa un 0.1% del total de las muestras del estudio (928 muestras), que es similar a la frecuencia encontrada por otros autores (Chitty et al., 2006; Comas et al., 2010; Papoulidis et al., 2012). Algunos estudios, refieren un riesgo menor del 0.1% de anomalías clínicamente significativas que no serían detectadas por la QF-PCR como técnica exclusiva (Caine et al., 2005; Ogilvie et al. 2005; Leung et al., 2008; Cirigliano et al., 2009; Badenas et al., 2010; Hills et al., 2010; Speevak et al., 2011; Mann et al., 2012).

Según nuestra experiencia hay que ser muy precavidos a la hora de prescindir del cariotipo convencional, ya que existe un riego significativo de resultados adversos que no serían detectados, esto supone un gran problema en los casos que no exista un aborto espontaneo en la mujer, debido a que daría lugar a recién nacidos con anomalías congénitas con los problemas emocionales y las consecuencias financieras que esto supone (Hills et al., 2010).

Como consecuencia de nuestro estudio se destaca la importancia de la ecografía fetal como examen rutinario, siendo la indicación principal para decidir si la QF-PCR debe ir precedida por el análisis del cariotipo convencional (Donaghue et al., 2005; Caine et al., 2005; Ogilvie et al., 2005; Cirigliano et al., 2006; Chitty et al., 2006; Kagan et al., 2007; Ogilvie et al., 2009; Badenas et al., 2010, Papoulidis et al., 2012; Mann et al., 2012). Los casos con hallazgos ecográficos anormales, incluyendo la translucencia nucal, marcadores suaves y anormalidades fetales estructurales, representan más del 50% de todas las anomalías cromosómicas clínicamente significativas (Kagan et al., 2007; Badenas et al., 2010; Comas et al., 2010).

5.6. RESULTADOS POSTNATALES.

Nuestros resultados indican que cuando se diagnostica una aneuploidía cromosómica en la que se espera un pronóstico grave, la mayoría de las parejas deciden interrumpir el embarazo (Hawkins et al., 2013; Suzumori et al., 2014). Si es cierto, que existe un porcentaje de casos con un cribado de anomalías cromosómicas de alto riesgo, en que la paciente declinó el ofrecimiento de diagnóstico invasivo y decidieron continuar con el embarazo por razones personales, debido posiblemente a creencias religiosas, o miedo a complicaciones de la prueba invasiva, independientemente de si había un riesgo bajo o grave de un fenotipo clínico anormal. Según esto, la gravedad de la anormalidad y la religiosidad juegan un papel importante en la toma de decisiones de los pacientes ante un caso con un pronóstico anormal (Balkan et al., 2010). Respecto a la distribución por sexos se observa, como era de esperar, una cierta predominancia de los fetos con sexo masculino.

6.CONCLUSIONES

1. La estimación del riesgo individual de cromosomopatía mediante el cribado combinado realizado en el primer trimestre de gestación en base a la edad materna, TN, marcadores bioquímicos y de los nuevos marcadores ecográficos (HN, RT, DV) puede identificar en el primer trimestre del embarazo más del 90% de los fetos afectados de trisomía 21 y otras anomalías cromosómicas con una tasa de falsos positivos del 2-3% disminuyendo de un modo muy significativo el número de procedimientos invasivos de diagnóstico prenatal.

2. La técnica QF-PCR diagnosticó el 96% de las anomalías cromosómicas clínicamente relevantes detectables mediante cariotipo convencional. Si se hubiese usado solamente la QF-PCR en el diagnóstico de anomalías cromosómicas, relegando la utilización del cariotipo convencional a indicaciones específicas (translucencia nucal aumentada ≥4.5 y otros hallazgos ecográficos anormales), en este caso se hubiesen diagnosticado el 99% de las anomalías clínicamente significativas y sólo el 0.1% del total de muestras analizadas (928) quedaría sin ser detectado.

3. El uso exclusivo de la QF-PCR para el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas, junto con el análisis del cariotipo sólo para determinadas indicaciones ecográficas específicas reduce los costes un 54%.

4. Las anomalías cromosómicas más frecuentes en la población gestante estudiada son: trisomía 21, trisomía 18 y trisomía 13 que representan el 74% de total de anomalías detectadas mediante cariotipo.

7.BIBLIOGRAFÍA

A

Adinolfi M, Sherlock J, Cirigliano V, Pertl B. Prenatal screening of aneuploidies by quantitative fluorescent PCR. Community Genet 2000;3:50-60.

Aksglaede L, Link K, Giwercman A, Jørgensen N, Skakkebaek NE, Juul A. 47,XXY Klinefelter syndrome: clinical characteristics and age-specific recommendations for medical management. Am J Med Genet C Semin Med Genet 2013;163(1):55-63.

Alfirevic Z, Sundberg K, Brigham S. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. Cochrane Database Syst Rev 2003. CD003252.

Allen EG, Freeman SB, Druschel C, Hobbs CA, O'Leary LA, Romitti PA, et al. Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects. Hum Genet 2009;125:41-52.

Allingham-Hawkins DJ, Chitayat D, Cirigliano V, Summers A, Tokunaga J, Winsor E, et al. Prospective validation of quantitative fluorescent polymerase chain reaction for rapid detection of common aneuploidies. Genet Med 2011;13(2):140-7.

Angell R. First-meiotic-division nondisjunction in human oocytes. Am J Hum Genet 1997;61:23-32.

Antsaklis A, Souka AP, Daskalakis G, Kavalakis Y, Michalas S. Second-trimester amniocentesis vs. chorionic villus sampling for prenatal diagnosis in multiple gestations. Ultrasound Obstet Gynecol 2002;20(5):476-81.

Arron JR, Winslow MM, Polleri A, Chang CP, Wu H, Gao X, et al. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. Nature 2006;441(7093):595-600.

B

Baffero GM, Somigliana E, Crovetto F, et al. Paffoni A, Persico N, Guerneri S, Lalatta F, Fogliani R, Fedele L. Confined placental mosaicism at chorionic villous sampling: risk factors and pregnancy outcome. Prenat Diagn 2012;32:1102-8.

Ball S, Ekelund C, Wright D, Kirkegaard I, Nørgaard P, Petersen OB, et al. Temporal effects of maternal and pregnancy characteristics on serum pregnancy-associated plasma protein-A and free β-human chorionic gonadotropin at 7-14 weeks' gestation. Ultrasound Obstet Gynecol 2013;41:33-9.

Barlow GM, Chen XN, Shi ZY, Lyons GE, Kurnit DM, Celle L, et al. Down syndrome congenital heart disease: a narrowed region and a candidate gene. Genet Med 2001;3:91-101.

Belichenko PV, Kleschevnikov AM, Salehi A, Epstein CJ, Mobley WC. Synaptic and cognitive abnormalities in mouse models of Down syndrome: Exploring genotype-phenotype relationships. J Comp Neurol 2007;504:329-45.

Bercovich D, Ganmore I, Scott LM, Wainreb G, Birger Y, Elimelech A, et al. Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. Lancet 2008;372:1484-92.

Berktold L, von Kaisenberg CS, Hillemanns P, Vaske B, Schmidt P. Analysis of the impact of PAPP-A, free b-hCG and nuchal translucency thickness on the advanced first trimester screening. Arch Gynecol Obstet 2013;287:413-20.

Bindra R, Heath V, Liao A, Spencer K, Nicolaides KH. One stop clinic for assessment of risk for trisomy 21 at 11–14 weeks: a prospective study of 15,030 pregnancies. Ultrasound Obstet Gynecol 2002;20:219-25.

Bischoff FZ, Hahn S, Johnson KL, Simpson JL, Bianchi DW, Lewis DE, et al. Intact fetal cells in maternal plasma: are they really there?. Lancet 2003;361:139-40.

Blumenfeld YJ, Chueh J. Chorionic villus sampling: technique and training. Curr Opin Obstet Gynecol 2010;22:146-51.

Bondy CA. Care of girls and women with Turner syndrome: A guideline of Turner syndrome study group. J Clin Endocrinol Metab 2007;92:10-25.

Brown L, Abigania M, Warburton D, Brown S. Validation of QF-PCR for prenatal aneuploidy screening in the United States. Prenat Diagn 2006;26:1068-74.

C

Caine A, Maltby AE, Parkin CA, et al. Prenatal detection of Down's syndrome by rapid aneuploidy testing for chromosomes 13, 18, and 21 by FISH or PCR without a full karyotype: a cytogenetic risk assessment. Lancet 2005;366:123-8.

Carlin AJ, Alfirevic Z. Techniques for chorionic villus sampling and amniocentesis: a survey of practice in specialist UK centres. Prenat Diagn 2008;28:914-9.

Cereda A, Carey JC. The trisomy 18 syndrome. Orphanet J Rare Dis 2012;23:7:81.

Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. Clin Chem 2004;50:88-92.

Chang YW, Chang CM, Sung PL, Yang MJ, Li WH, Chen LC, et al. An overview of a 30-year experience with amniocentesis in a single tertiary medical center in Taiwan. Taiwan J Obstet Gynecol 2012;51:206-11.

Chen CP, Chang SD, Chueh HY, Su YN, Su JW, Chern SR, et al. Rapid positive confirmation of trisomy 21 mosaicism at amniocentesis by interphase FISH, QF-PCR and aCGH on uncultured amniocytes. Taiwan J Obstet Gynecol 2012;51:475-80.

Chim SS, Tong YK, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LY, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:14753-58.

Chim SS, Jin S, Lee TY, Lun FM, Lee WS, Chan LY, et al. Systematic Search for Placental DNA-Methylation Markers on Chromosome 21: Toward a Maternal Plasma-Based Epigenetic Test for Fetal Trisomy 21. Clin Chem 2008;54:500-11

Chitty LS, Kagan KO, Molina FS, Waters JJ, Nicolaides KH. Fetal nuchal translucency scan and early prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities by rapid aneuploidy screening: observational study. BMJ 2006;332:452-5.

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.

Chuchracki M, Janiak J, Ziółkowska K, Sedziak A, Opala T. Edwards syndrome most frequent indications for genetic amniocentesis. Analysis of the last 5 years. Przegl Lek 2012;69:1007-10.

Cicero S, Avgidou K, Rembouskos G, Kagan KO, Nicolaides KH. Nasal bone in first-trimester screening for trisomy 21. Am J Obstet Gynecol 2006;195:109-14.

Cicero S, Bindra R, Rembouskos G, Tripsanas C, Nicolaides KH. Fetal nasal bone length in chromosomally normal and abnormal fetuses at 11-14 weeks of gestation. J Matern Fetal Neonatal Med 2002;11:400-2.

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;358:1665-7.

Cicero S, Longo D, Rembouskos G, Sacchini C, Nicolaides KH. Absent nasal bone at 11-14 weeks of gestation and chromosomal defects. Ultrasound Obstet Gynecol 2003a;22:31-5.

Cicero S, Sacchini C, Rembouskos G, Nicolaides KH. Sonographic Markers of Fetal Aneuploidy—A Review. Placenta 2003b;24 (Suppl B):S88-98.

Cicero S, Bindra R, Rembouskos G, Spencer K, Nicolaides KH. Integrated ultrasound and biochemical screening for trisomy 21 using fetal nuchal translucency, absent fetal nasal bone, free β-hCG and PAPP-A at 11 to 14 weeks. Prenat Diagn 2003c;23:306-10.

Cirigliano V, Voglino G, Canadas MP, Marongiu A, Ejarque M, Ordonez E, et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18,000 consecutive clinical samples. Mol Hum Reprod 2004;10:839-46.

Cirigliano V, Voglino G, Marongiu A, Cañadas P, Ordoñez E, Lloveras E, et al. Rapid prenatal diagnosis by QF-PCR: evaluation of 30,000 consecutive clinical samples and future applications. Ann N Y Acad Sci 2006;1075: 288-98.

Cirigliano V, Voglino G, Ordoñez E, Marongiu A, Paz Cañadas M, Ejarque M, et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR, results of 9 years of clinical experience. Prenat Diagn 2009;29:40-9.

Comas C, Echevarria M, Carrera M, Serra B. Rapid aneuploidy testing versus traditional karyotyping in amniocentesis for certain referral indications. J Matern Fetal Neonatal Med 2010;23:949-55.

Costa AC. Alzheimer disease: Treatment of Alzheimer disease in Down syndrome. Nat Rev Neurol 2012;8:182-4.

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;94:387-92.

D

Davenport ML. Approach to the patient with Turner syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2010;95:1487-95.

Delabar JM, Theophile D, Rahmani Z, et al. Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. Eur J Hum Genet 1993;1:114-24.

Devaney SA, Palomaki GE, Scott JA, Bianchi DW. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. JAMA 2011;306:627-36.

Donaghue C, Mann K, Docherty Z, et al. Detection of mosaicism for primary trisomies in prenatal samples by QF-PCR and karyotype analysis. Prenat Diagn 2005;25:65-72.

Donaghue C, Roberts A, Mann K, Ogilvie CM. Development and targeted application of a rapid QF-PCR test for sex chromosome imbalance. Prenat Diagn 2003;23:201-10.

Down LJ. Observations on an ethnic classification of idiots. Clinical Lectures and Reports, London Hospital 1866;3:259-62

Dutta UR, Pidugu VK, Goud V, Dalal AB. Mosaic down syndrome with a marker: molecular cytogenetic characterization of the marker chromosome. Gene 2012;495: 199-204.

E

Edwards JH, Harnden DG, Cameron AH, Crosse VM, Wolff OH. A new trisomic syndrome.Lancet 1960;1:787-9.

Efthymiadou A, Stefanou EG, Chrysis D. 45,X/46,XY mosaicism: a cause of short stature in males. Hormones (Athens) 2012;11:501-4.

Ekelund C, Wright D, Ball S, Kirkegaard I, Nørgaard P, Sørensen S, et al. Prospective study evaluating performance of first-trimester combined screening for trisomy 21 using repeat sampling of maternal serum markers PAPP-A and free β-hCG. Ultrasound Obstet Gynecol 2012;40:276-81.

Elsheikh M, Dunger DB, Conway GS, Wass JA. Turner’s syndrome in adulthood. Endocr Rev 2002;23:120-40.

F

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;26:22-27.

Fairbrother G, Johnson S, Musci TJ, Song K. Clinical experience of noninvasive prenatal testing with cell-free DNA for fetal trisomies 21, 18, and 13, in a general screening population. Prenat Diagn 2013;15:1-5.

Falcon O, Faiola S, Huggon I, Allan L, Nicolaides KH. Fetal tricuspid regurgitation at the 11 + 0 to 13 + 6-week scan: association with chromosomal defects and reproducibility of the method. Ultrasound Obstet Gynecol 2006;27:609-12.

Florjański J, Fuchs T, Zimmer M, Homola W, Pomorski M, Blok D. The role of ductus venosus Doppler flow in the diagnosis of chromosomal abnormalities during the first trimester of pregnancy. Adv Clin Exp Med 2013;22:395-401.

Freeman SB, Bean LH, Allen EG, Tinker SW, Locke AE, Druschel C, et al. Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: a report from the National Down Syndrome Project. Genet Med 2008;10:173-80.

Freeman SB, Allen EG, Oxford-Wright CL, Tinker SW, Druschel C, Hobbs CA, et al. The National Down Syndrome Project: design and implementation. Public Health Rep 2007;122:62-72.

G

Geipel A, Willruth A, Vieten J, Gembruch U, Berg C. Nuchal fold thickness, nasal bone absence or hypoplasia, ductus venosus reversed flow and tricuspid valve regurgitation in screening for trisomies 21, 18 and 13 in the early second trimester. Ultrasound Obstet Gynecol 2010;35:535-39.

Gekas J, van den Berg DG, Durand A, Vallée M, Wildschut HI, Bujold E, et al. Rapid testing versus karyotyping in Down's syndrome screening: cost-effectiveness and detection of clinically significant chromosome abnormalities. Eur J Hum Genet 2011;19:3-9.

Gerulewicz Vannini D, Hernández-Andrade E. Marcadores bioquímicos de primer y segundo trimestre de cromosompatías. En: Cabero L, Saldívar D, Cabrillo E, editores. Obstetricia y medicina Materno-fetal. 1ª ed. Madrid: Editorial médica panaméricana; 2007. p.1287-88.

Ghaffari SR, Tahmasebpour AR, Jamal A, Hantoushzadeh S, Eslamian L, Marsoosi V, et al. First-trimester screening for chromosomal abnormalities by integrated application of nuchal translucency, nasal bone, tricuspid regurgitation and ductus venosus flow combined with maternal serum free β-hCG and PAPP-A: a 5-year prospective study. Ultrasound Obstet Gynecol 2012;39:528-34.

Ghosh S, Feingold E, Dey SK. Etiology of Down Syndrome: Evidence for consistent association among altered meiotic recombination, nondisjunction and maternal age across populations. Am J Med Genet A 2009;149:1415-20.

Gnyś-Wiercioch A, Bloch R, Grolik B, Hadaś J, Kania A, Szołtysik-Szot M, Sodowska H. Chorionic Villus Sampling in cytogenetic analysis--disadvantages and advantages. Ginekol Pol 2012;83:368-72.

Goodfellow LR, Batra G, Hall V, McHale E, Heazell AE. A case of confined placental mosaicism with double trisomy associated with stillbirth. Placenta 2011;32:699-703.

Gratacós E, Nicolaides K. Clinical perspective of cell-free DNA testing for fetal aneuploidies. Fetal Diagn Ther 2014;35(3):151-5.

Groth KA, Skakkebæk A, Høst C, Gravholt CH, Bojesen A. Clinical review: Klinefelter syndrome--a clinical update. J Clin Endocrinol Metab 2013;98:20-30.

H

Hallahan T, Krantz D, Orlandi F, Rossi C, Curcio P, Macri S, et al. First trimester biochemical screening for Down syndrome: free beta hCG versus intact hCG. Prenat Diagn 2000;20:785-9.

Hassold T, Hunt P. Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew. Curr Opin Pediatr 2009;21:703-8.

Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, et al. Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. Environ Mol Mutagen 1996;28:167-75.

Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. Hum Mol Genet 2007;16 Spec No. 2:R203-8.

Hawk AF, Saller DN. Screening for fetal aneuploidy: is maternal age relevant? Clin Obstet Gynecol 2012;55:217-25.

Hills A, Donaghue C, Waters J, Waters K, Sullivan C, Kulkarni A, et al. QF-PCR as a stand-alone test for prenatal samples: the first 2 years' experience in the London region. Prenat Diagn 2010;30:509-17.

Holgado E, Liddle S, Ballard T, Levett L. Incidence of placental mosaicism leading to discrepant results between QF-PCR and karyotyping in 22,825 chorionic villus samples. Prenat Diagn 2011; 31:1029-38.

Hulten M, Patel S, Jonasson J, Iwarsson E. On the origin of the maternal age eVect in trisomy 21 Down syndrome: the Oocyte Mosaicism Selection (OMS) model. Reproduction 2010;139:1-9.

Hultén MA, Patel SD, Westgren M, Papadogiannakis N, Jonsson AM, Jonasson J, et al. On the paternal origin of trisomy 21 Down syndrome. Mol Cytogenet 2010;3:4.

Hultén MA, Patel SD, Tankimanova M, Westgren M, Papadogiannakis N, Jonsson AM, et al. On the origin of trisomy 21 Down syndrome. Mol Cytogenet 2008;1:21.

Huynh L, Kingdom J, Akhtar S. Low pregnancy-associated plasma protein A level in the first trimester. Can Fam Physician 2014;60:899-903.

I

Illanes S, Denbow ML, Smith RP, Overton TG, Soothill PW, Finning K. Detection of cell-free fetal DNA in maternal urine. Prenat Diagn 2006;26:1216-8.

J

Jacobson CB, Barter RH. Intrauterine diagnosis and management of genetic defects. Am J Obstet Gynecol 1967;99:796-80.

Jensen TJ, Zwiefelhofer T, Tim RC, Džakula Z, Kim SK, Mazloom AR, et al. High-throughput massively parallel sequencing for fetal aneuploidy detection from maternal plasma. PLoS One 2013;8:e57381.

Jones KT. Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. Human Reproduction Update 2008;14:143-58.

Jorde Lynn B, Carey John C, Bamshad Michael J. Genética Médica. 4ºed. Barcelona. Elsevier. 2011.

K

Kagan KO, Avgidou K, Molina FS, Gajewska K, Nicolaides KH. Relation between increased fetal nuchal translucency thickness and chromosomal defects. Obstet Gynecol 2006;107:6-10.

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 2009a;33:259-64.

Kagan KO, Etchegaray A, Zhou Y, Wright D, Nicolaides KH. Prospective validation of first-trimester combined screening for trisomy 21. Ultrasound Obstet Gynecol 2009b;34:14-8.

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 2009c;33:18-22.

Kagan KO, Wright D, Baker A, Sahota D, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 by maternal age, fetal nuchal translucency thickness, free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. Ultrasound Obstet Gynecol 2008a;31:618–24.

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 2008b;31:493-502.

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;36:542-7.

Karadzov-Orlić N, Egić A, Filimonović D, Marinković M, Damnjanović-Pazin B, Milovanović Z, et al. Screening for aneuploidies by maternal age, fetal nuchal translucency and maternal serum biochemistry at 11-13+6 gestational weeks. Srp Arh Celok Lek 2012;140:606-11.

Khalil A, Syngelaki A, Maiz N, Zinevich Y, Nicolaides KH. Maternal age and adverse pregnancy outcome: a cohort study. Ultrasound Obstet Gynecol 2013;42:634-43.

Klinefelter HF, Reifenstein EC, Albright F. Syndrome characterized by gynecomastia aspermatogenes without A-Leydigism and increased excretion of follicle stimulating hormone. J Clin Endocrinol Metab 1942;2:615-27.

Kollmann M, Haeusler M, Haas J, Csapo B, Lang U, Klaritsch P. Procedure-related complications after genetic amniocentesis and chorionic villus sampling. Ultraschall Med 2013;34:345-8.

Korbel JO, Tirosh-Wagner T, Urban AE, Chen XN, Kasowski M, Dai L, et al. The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106:12031-6.

Korenberg J. Down syndrome phenotype mapping. In: Epstein C, editor. Progress in clinical and biological research. New York: Wiley-Liss;1991.p.337.

Kornacki J, Ziółkowska K, Goździewicz T, Skrzypczak J. Results of cytogenetic examinations in fetuses with increased nuchal translucency. Ginekol Pol 2012;83:189-93.

L

Labeau-Gaüzere C, Horovitz J, Brun JL, Saura R, Toutain J. Confined placental mosaicisms a priori from meiotic origin: analysis of 10 cases. Gynecol Obstet Fertil 2011;39:117-20.

Lamb NE, Yu K, Shaffer J, Feingold E, Sherman SL. Association between maternal age and meiotic recombination for trisomy 21. Am J Hum Genet 2005;76:91-9.

Leon E, Zou YS, Milunsky JM. Mosaic Down syndrome in a patient with low level mosaicism detected by microarray. Am J Med Genet 2010;152:3154-6.

Letourneau A, Antonarakis SE. Genomic determinants in the phenotypic variability of Down syndrome. Prog Brain Res 2012;197:15-28.

Letourneau A, Santoni FA, Bonilla X, Sailani MR, Gonzalez D, Kind J, et al. ―Domains of genome-wide gene expression dysregulation in Down's syndrome" Nature 2014;508:345-50.

Leung WC, Lau ET, Lao TT, Tang MH. Rapid aneuploidy screening (FISH or QF-PCR): the changing scene in prenatal diagnosis? Expert Rev Mol Diagn 2004;4:333-7.

Leung WC, Lau ET, Lau WL, et al. Rapid aneuploidy testing (knowing less) versus traditional karyotyping (knowing more) for advanced maternal age: what would be missed, who should decide? Hong Kong Med J 2008;14:6-13.

Lin TM, Galbert SP, Kiefer D, Spellacy WN, Gall S. Human pregnancy associated plasma proteins during postpartum period. Am J Obstet Gynecol 1976;124:382-7.

Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet 1997;350:485-7.

Lo YM. Recent advances in fetal nucleic acids in maternal plasma. J Histochem Cytochem 2005;53:293-6.

Lun FM, Chiu RW, Allen Chan KC, Yeung Leung T, Kin Lau T, Dennis Lo YM. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. Clin Chem 2008;54:1664-72.

Lyle R, Béna F, Gagos S, Gehrig C, Lopez G, Schinzel A, et al. Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. Eur J Hum Genet 2009;17:454-66.

Laopaiboon M, Lumbiganon P, Intarut N, Mori R, Ganchimeg T, Vogel JP, Souza JP, Gülmezoglu AM. Advanced maternal age and pregnancyoutcomes: a multicountry assessment. BJOG 2014;121 (Suppl 1):49-56.

M

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+0-13+6 weeks of gestation. Ultrasound Obstet Gynecol 2009;33:512-7.

Mann K, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Ogilvie CM. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. Eur J Hum Genet 2004;12:907-15.

Mann K, Fox SP, Abbs SJ, Yau SC, Scriven PN, Docherty Z, Ogilvie CM. Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. Lancet 2001;358:1057-61.

Mansfield ES. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. Hum Mol Genet 1993;2:43-50.

Masihi S, Barati M, Mohamadjafari R, Hashemi M. Assessemnt of nasal bone in first trimester screening for chromosomal abnormalities in Khuzestan. Iran J Reprod Med 2014;12:321-6.

McLennan A, Schluter PJ, Pincham V, Hyett J. First-trimester fetal nasal bone audit: evaluation of a novel method of image assessment. Ultrasound Obstet Gynecol 2009;34: 623-8.

Michailidis G, Economides D. Nuchal translucency measurement and pregnancy outcome in karyotypically normal fetuses. Ultrasound in obstetrics & gynecology 2002;17:102-5.

Molina García FS, Carrillo Badillo MP, Zaragoza García EA, Fernández de Santos AG, Montoya Ventoso F. Analysis of secondary ultrasound markers in the first trimester before chorionic villus sampling. Prenat Diagn 2012;30:1117-20.

Morris JK, Savva GM. The risk of fetal loss following a prenatal diagnosis of trisomy 13 or trisomy 18. Am J Med Genet 2008;146:827-32.

Morris JK, Wald NJ, Mutton DE, Alberman E. Comparison of models of maternal age-specific risk for Down syndrome live births. Prenat Diagn 2003;23:252-8.

Mueller RF, Young ID. Emery´s Genética Médica. España: Marbán Libros, SL; 2001.

Murta CG, Moron AF, Avila MA, Weiner CP. Application of ductus venosus Doppler velocimetry for the detection of fetal aneuploidy in the first trimester of pregnancy. Fetal Diagn Ther 2002;17:308-14.

N

Nicolaides K. Nuchal translucency and other first trimester sonographic marker of chromosomal abnormalities. Am Journal Obstet and Gynecol 2004;191:45-67.

Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. Br Med J 1992;304:867-89.

Nicolaides KH, Orlando F. La ecografía de las 11-13+6 semanas. The Fetal Medicine Foundation. Disponible en: http://www.fetalmedicine.com

Nicolaides KH, Spencer K, Avgidou K, Faiola S, Falcon O. Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening. Ultrasound Obstet Gynecol 2005a;25:221-26.

Nicolaides KH, Heath V, Cicero S. Increased fetal nuchal translucency at 11–14 weeks. Prenat Diagn 2002;22:308-15.

Nicolaides KH. Firts-trimester screening for chromosomal abnormalities. Semin Perinatol 2005b;20:190-4.

Nicolaides KH. Screening for chromosomal defects. Ultrasound Obstet Gynecol 2003;21:313-21.

Nicolaides KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. Prenat Diagn 2011;31:7-15.

Nicolaidis P, Petersen MB. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. Hum Reprod 1998;13:313-9.

Nicolini U, Lalatta F, Natacci F, Curcio C, Bui TH. The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration. Hum Reprod Update 2004;10:541-8.

Nikolaienko O, Nguyen C, Crinc LS, Cios KJ, Gardiner K. Human chromosome 21/Down syndrome gene function and pathway database. Gene 2005;364:90-8.

Novo Villaverde, FJ. Genética Humana. Conceptos, mecanismos y aplicaciones de Genética en el campo de la Biomedicina. Madrid: Pearson Educación; 2007.

Nussbaum RL, Mclnnes RR, Willard HR. Thompson and Thompson. Genética en Medicina. 7ºed. Barcelona: Elsevier;2008.

Nygren AO, Dean J, Jensen TJ, et al. Quantification of fetal DNA by use of methylation-based DNA discrimination. Clin Chem 2010;56:1627-35.

O

Ogilvie CM, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Mann K. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy using quantitative fluorescence-PCR (QF-PCR). J Histochem Cytochem 2005a;53:285-8.

Ogilvie CM, Lashwood A, Chitty L, et al. The future of prenatal diagnosis: rapid testing or full karyotype? An audit of chromosome abnormalities and pregnancy outcomes for women referred for Down's Syndrome testing. BJOG 2005b;112:1369-75.

Ogilvie CM. Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: past, present and future. Path Biol 2003;51:156-60.

Oliver TR, Feingold E, Yu K, Cheung V, Tinker S, Yadav-Shah M, Masse N, Sherman SL. New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes. PLoS Genetics 2008;4:e1000033.

Olson LE, Richtsmeier JT, Leszl J, Reeves RH. A chromosome 21 critical region does not cause specific Down syndrome phenotypes. Science 2004;306:687-90.

Ong CYT, Liao AW, Spencer K, Munim S, Nicolaides KH. First trimester maternal serum free β human chorionic gonadotrophin and pregnancy associated plasma protein A as predictors of pregnancy complications. BJOG 2000;107:1265-70.

Orlandi F, Rossi C, Orlandi E, Jakil MC, Hallahan TW, Macri VJ, Krantz DA. First-trimester screening for trisomy-21 using a simplified method to assess the presence or absence of the fetal nasal bone. Am J Obstet Gynecol 2005;192:1107-11.

P

Pacchierotti F, Adler ID, Eichenlaub-Ritter U, Mailhes JB. Gender effects on incidence of aneuploidy in mammalian germ cells. Environ Res 2007;104:46-69.

Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, et al. DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. Genet Med 2012;14:296-305.

Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, et al. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: An international clinical validation study. Genet Med 2011;13:913-20.

Papageorgiou EA, Karagrigoriou A, Tsaliki E, Velissariou V, Carter NP, Patsalis PC. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. Nat Med 2011;17:510-3.

Papoulidis I, Siomou E, Sotiriadis A, Efstathiou G, Psara A, Sevastopoulou E, et al. Dual testing with QF-PCR and karyotype analysis for prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities. Evaluation of 13,500 cases with consideration of using QF-PCR as a stand-alone test according to referral indications. Prenat Diagn 2012;32:680-5.

Patau K, Smith DW, Therman E, Inhorn SL, Wagner HP. Multiple congenital anomaly caused by extra chromosome. Lancet 1960;1:790-3.

Patil M, Panchanadikar TM, Wagh G. Variation of papp-a level in the first trimester of pregnancy and its clinical outcome. J Obstet Gynaecol 2014;64:116-9.

Patterson D. Molecular genetic analysis of Down syndrome. Hum Genet 2009;126:195-214.

Pellestor F, Anahory T, Hamamah S. Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. Cytogenet Genome Res 2005;111:206-12.

Penrose LS. The relative effect of paternal and maternal age in mongolism. Journal of Genetics 1933;27:219-24.

Penrose, L.S. The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. J. Genet. 1933;88:9-14.

Peroos S, Forsythe E, Pugh JH, Arthur-Farraj P, Hodes D. Longevity and Patau syndrome: what determines survival? BMJ Case Rep 2012.pii:bcr0620114381.

Pertl B, Yau SC, Sherlock J, Davies AF, Mathew CG, Adinolfi M. Rapid molecular method for prenatal detection of Down's syndrome. Lancet 1994;343:1197-98.

Peterson SE, Simhan HN. First-trimester pregnancy-associated plasma protein Aand subsequent abnormalities of fetal growth. Am J Obstet Gynecol 2008;198:43-5.

Pierce B. Genética: Un enfoque conceptual. 3ªed. Madrid: Médica Panamericana; 2009.

Plaiasu V, Ochiana D, Motei G, Anca I, Georgescu A. Clinical relevance of cytogenetics to pediatric practice. Postnatal findings of Patau syndrome - Review of 5 cases. Maedica (Buchar) 2010;5:178-85.

Programa para el screening de síndrome de Down. SsdwLab V 4.1. 2001.

Protocolos SEGO. Diagnóstico prenatal de los defectos congénitos. Cribado de anomalías cromosómicas. Disponible en: www.prosego.com

R

Resta RG. Historical aspects of genetic counseling: why was maternal age 35 chosen as the cut-off for offering amniocentesis? Med Secoli 2002;14:793-811.

Rijnders RJ, Van Der Luijt RB, Peters ED, Goeree JK, Van Der Schoot CE, Ploos Van Amstel JK, et al. Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma DNA. Prenat Diagn 2003;23:1042-4.

Robberecht C, Voet T, Utine GE, Schinzel A, de Leeuw N, Fryns JP, Vermeesch J. Meiotic errors followed by two parallel postzygotic trisomy rescue events are a frequent cause of constitutional segmental mosaicism. Mol Cytogenet 2012;10:5:19.

Robinson HP, Fleming JE. A critical evaluation of sonar "crown rump length" measurements. Br J Obstet Gynaecol 1975;82:702-10.

Roizen NJ, Patterson D. Down’s syndrome. Lancet 2003;361:1281-9.

Romero Casanova CM. Aspectos clínicos del consejo genético. En: delgado Rubio A, editor. Asesoramiento genético en la práctica médica. Madrid: Médica Panamericana;2011.p.180-82.

Roper RJ, Reeves RH. Understanding the basis for Down syndrome phenotypes. PLoS Genet 2006;2:e50.

Rosenbusch B. The incidence of aneuploidy in human oocytes assessed by convencional cytogenetic analysis. Hereditas 2004:141:97-105.
Ryall et al., 2001;

S

Sairam S, Carvalho JS. Early fetal echocardiography and anomaly scan in fetuses with increased nuchal translucency. Early Human De¬velopment 2012;88:269-72.

Salehi A, Delcroix JD, Belichenko PV, Zhan K, Wu C, Valletta JS, et al. Increased App Expression in a Mouse Model of Down's Syndrome Disrupts NGF Transport and Causes Cholinergic Neuron Degeneration. Neuron 2006;51:29-42.

Salman Guraya S. The associations of nuchal translucency and fetal abnormalities; significance and implications. J Clin Diagn Res 2013;7:936-41.

Shaffer LG, Bui TH. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. Am J Med Genet C Semin Med Genet 2007;145:87-98.

Sherman SL, Allen EG, Bean LH, Freeman SB. Epidemiology of Down syndrome. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2007;13:221-27

Shi Y, Kirwan P, Smith J, MacLean G, Orkin SH, Livesey FJ. A human stem cell model of early Alzheimer's disease pathology in Down syndrome. Sci Transl Med 2012; 4:124ra29.

Shiefa S, Amargandhi M, Bhupendra J, Moulali S, Kristine T. First Trimester Maternal Serum Screening Using Biochemical Markers PAPP-A and Free β-hCG for

Down Syndrome, Patau Syndrome and Edward Syndrome. Indian J Clin Biochem 2013;28:3-12.

Škerget AE, Herode ž SS, Zagorac A, Zagradi š nik B, Mujezinović F, Vokač NK. Slovenian five-year experiences with rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies using quantitative-fluorescence polymerase chain reaction. Genet Test Mol Biomarkers 2013;52:669-74.

Snijders RJM, Sebire N, Nicolaides KH. Maternal age and gestational age-specific risk for chromosomal defects. Fetal Diagn Ther 1995;10:356–67.

Sonek J, Nicolaides K. Additional first-trimester markers. Clin Lab Med 2010;30:573-92.

Sonek JD, McKenna D, Webb D, Croom C, Nicolaides K. Nasal bone length throughout gestation: normal ranges based on 3537 fetal ultrasound measurements. Ultrasound Obstet Gynecol 2003;21:152-55.

Sonek JD, Nicolaides KH, Janku P. Screening at 11-13+6 weeks' gestation. Ceska Gynekol 2012;77:92-104.

Souka A, Molina F, Nicolaides KH. Ecografía de primer trimestre (11 a 14 semanas). En: Gratacós E, Gómez R, Nicolaides K, Romero R, Cabero L, editores. Medicina Fetal. 1ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2009.p.129-35.

Souka AP, von Kaisenberg CS, Hyett JA, Sonek JD, Nicolaides KH. Increased nuchal translucency with normal karyotype. American journal of obstetrics and gynecology 2005;192:1005-21.

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;32:3-9.

Speevak MD, McGowan-Jordan J, Chun K. The detection of chromosome anomalies by QF-PCR and residual risks as compared to G-banded analysis. Prenat Diagn 2011;31:454-8.

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 2003a;23:851-55.

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. Ann Clin Biochem 2002;39:567-76.

Spencer K, Spencer CE, Power M, Dawson C, Nicolaides KH. Screening for chromosomal abnormalities in the first trimester using ultrasound and maternal serum biochemistry in a one stop clinic: a review of three years prospective experience. BJOG 2003b;110:281-6.

Spencer K, Spencer CE, Power M, Moakes A, Nicolaides KH. One stop clinic for assessment of risk for fetal anomalies: a report of the first year of prospective screening for chromosomal anomalies in the first trimester. Br J Obstet Gynaecol 2000;107:1271-75.

Steuerwald NM, Bermúdez MG, Wells D, Munné S, Cohen J. Maternal age-related differential global expression profiles observed in human oocytes. Reprod Biomed Online 2007;14:700-8.

Stewart TL. Screening for aneuploidy: the genetic sonogram. Obstet Gynecol Clin North Am 2004;31:21-33.

Strauss A, Heer IM, Spelsberg F, Strauss C. Down Syndrome: what do pregnant women know about their individual risk? A prospective trial. Arch Gynecol Obstet 2013;287:1119-23.

Sun I, Overgaard M, Oxvig C, Giudice L. Pregnancy-Associated Plasma Protein A Proteolytic Activity Is Associated with the Human Placental Trophoblast Cell Membrane. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:5235-40.

Sundberg K, Bang J, Smidt-Jensen S, Brocks V, Lundsteen C, Parner J, Keiding N, Philip J. Randomised study of risk of fetal loss related to early amniocentesis versus chorionic villus sampling. Lancet 1997;350: 697-703.

Suwanrath C, Pruksanusak N, Kor-Anantakul O, Suntharasaj T, Hanprasertpong T, Pranpanus S. Reliability of fetal nasal bone length measurement at 11-14 weeks of gestation. BMC Pregnancy Childbirth 2013;16:13-7.

T

Tabor A, Vestergaard CH, Lidegaard O. Fetal loss rate after chorionic villus sampling and amniocentesis: an 11-year national registry study. Ultrasound Obstet Gynecol 2009;34:19-24.

Tahmasebpour A, Rafiee NB, Ghaffari S, Jamal A. Increased nuchal translucency and pregnancy outcome. Iran J Public Health 2012;41:92-7.

Tong YK, Ding C, Chiu RW, Gerovassili A, Chim SS, Leung TY, Leung TN, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM. Noninvasive Prenatal Detection of Fetal Trisomy 18 by Epigenetic Allelic Ratio Analysis in Maternal Plasma: Theoretical and Empirical Considerations. Clin Chem 2006;52:2194-202.

Toyama JM, Brizot ML, Liao AW, Lopes LM, Nomura RM, Saldanha FA, Zugaib M. Ductus venosus blood flow assessment at 11 to 14 weeks of gestation and fetal outcome. Ultrasound Obstet Gynecol 2004;23:341-45.

Tseng JJ, Chou MM, Lo FC, Lai HY, Chen MH. Detection of chromosome aberration in the second trimester using genetic amniocentesis: experience during 1995–2004. Taiwan J Obstet Gynecol 2006;45:39-41.

Tucker ME, Garringer HJ, Weaver DD. Phenotypic spectrum of mosaic trisomy 18: two new patients, review of the literature and counseling issues. Am J Med Genet 2007;143A:505-17.

Turleau C, Vekemans M. Trisomy 21: fifty years between medicine and science 2010; 26:267-72.

Turner HH. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck and cubitus valgus. Endocrinology 1938;23:566-74.

V

Vaiopoulos AG, Athanasoula KC, Papantoniou N, Kolialexi A. Review: advances in non-invasive prenatal diagnosis. In Vivo 2013;27:165-70.

van Wijk IJ, de Hoon AC, Jurhawan R, Tjoa ML, Griffioen S, Mulders MA, van Vugt JM, Oudejans CB. Detection of apoptotic fetal cells in plasma of pregnant women. Clin Chem 2000;46:729-31.

Visootsak J, Graham JM Jr. Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies. Orphanet J Rare Dis 2006;1:42.

W

Wallerstein R, Yu MT, Neu RL, Benn P, Lee Bowen C, Crandall B, et al. Common trisomy mosaicism diagnosed in amniocytes involving chromosomes 13, 18, 20 and 21: karyotype-phenotype correlations. Prenat Diagn 2000;20:103-22.

Wang PH, Cheng MH. Amniotic fluid cytokines predict pregnancy outcome: myth or reality? J Chin Med Assoc 2009;72:617-18.

Warburton D. Biological aging and the etiology of aneuploidy. Cytogenet Genome Res 2005;111:266-72.

Wechsler J, Greene M, McDevitt MA, Anastasi J, Karp JE, Le Beau MM, Crispino JD. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. Nat Genet 2002;32:148-52.

Wilson RD, Davies G, Gagnon A, Desilets V, Reid GJ, Summers A, et al. Amended Canadian guideline for prenatal diagnosis (2005) change to 2005-techniques for prenatal diagnosis. J Obstet Gynaecol Can 2005;27:1048-62.

Wiseman FK, Alford KA, Tybulewicz VL, Fisher EM. Down syndrome-Recent progress and future prospects. Hum. Mol. Genet 2009;18(R1):R75-83.

Witters G, Van Robays J, Willekes C, Coumans A, Peeters H, Gyselaers W, Fryns JP. Trisomy 13, 18, 21, Triploidy and Turner syndrome: the 5T's. Look at the hands. Facts Views Vis Obgyn 2011;3:15-21.

Wright D, Kagan KO, Molina FS, Gazzoni A, Nicolaides KH. A mixture model of nuchal translucency thickness in screening for chromosomal defects. Ultrasound Obstet Gynecol 2008;31:376-83.

Wright D, Spencer K, Kagan K K, Tørring N, Petersen OB, Christou A, Kallikas J, Nicolaides KH. First-trimester combined screening for trisomy 21 at 7-14 weeks' gestation. Ultrasound Obstet Gynecol 2010;36:404-11.

Y

Yair J, Chueh B, Chueh J. Chorionic villus sampling: technique and training. Curr Opin Obstet Gynecol 2010;22:146-51.

Young C, von Dadelszen P, Alfirevic Z. Instruments for chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. Cochrane Database Syst Rev 2013;1:CD000114.

Z

Zimmermann B, El-Sheikhah A, Nicolaides K, Holzgreve W, Hahn S. Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. Clin Chem 2005;51:1598-604.