



Cribado de aneuploidías de primer trimestre en las gestaciones gemelares

Pilar Prats Rodríguez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

CRIBADO DE ANEUPLOIDÍAS DE PRIMER TRIMESTRE EN LAS GESTACIONES GEMELARES

Pilar Prats Rodríguez



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA



CRIBADO DE ANEUPLOIDÍAS DE PRIMER TRIMESTRE EN LAS GESTACIONES GEMELARES

Memoria presentada por
Pilar Prats Rodríguez
para optar al grado de DOCTOR por la UB

Programa de Doctorado de Medicina

DIRECTORES:
Carmen Comas Gabriel, Bienvenido Puerto Navarro

TUTOR:
Bienvenido Puerto Navarro

Barcelona, febrero de 2013

Para Pilar, mi madre, y Alex, mi hija.

Índice

1. PRESENTACIÓN DE LA TESIS	9
2. AGRADECIMIENTOS	11
3. ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO.....	13
4. INTRODUCCIÓN	15
4.1 Prevalencia de las gestaciones múltiples	15
4.2 Riesgo de aneuploidías en la gestación gemelar en función de la corionicidad	20
4.3 Estado actual del cribado en las gestaciones únicas	23
4.4 Aspectos específicos del cribado y diagnóstico de aneuploidías en la gestación gemelar. Importancia del problema	28
4.5 Factores determinantes de la estimación del riesgo en el primer trimestre en gestaciones gemelares	30
4.5.1 Edad materna avanzada	30
4.5.2 Translucencia nucal (TN)	32
4.5.3 El test combinado. Estado actual	35
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS ..	39
6. HIPÓTESIS DE TRABAJO	43
7. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	45
8. MATERIAL Y MÉTODOS	47
8.1 Estudio I	47
8.2 Estudio II	50
9. RESULTADOS	53

9.1 Estudio I	53
9.2 Estudio II	62
10. DISCUSIÓN	71
11. CONCLUSIONES	105
12. BIBLIOGRAFÍA	107
13. ANEXO	129
Artículo I	129
Artículo II	137

1. Presentación de la tesis

Esta Tesis se presenta en forma de compendio de publicaciones según la normativa aprobada por la Comisión de Doctorado de la Universidad de Barcelona.

Su núcleo principal son dos artículos originales que han sido publicados en revistas internacionales en las que el doctorando es el primer firmante en todos ellos.

Estos artículos se centran en el cribado de aneuploidías de primer trimestre en las gestaciones gemelares.

Los dos artículos originales son los siguientes:

I. "EARLY FIRST-TRIMESTER FREE- β -hCG AND PAPP-A SERUM DISTRIBUTIONS IN MONOCHORIONIC AND DICHORIONIC TWINS"

Pilar Prats, Nacho Rodríguez, Joan Nicolau, Carmina Comas

Prenatal Diagnosis 2012, 32, 64–69.

II. "FIRST TRIMESTER RISK ASSESSMENT FOR TRISOMY 21 IN TWIN PREGNANCIES COMBINING NUCHAL TRANSLUCENCY AND FIRST TRIMESTER BIOCHEMICAL MARKERS"

Pilar Prats, Ignacio Rodríguez, Carmina Comas, Bienvenido Puerto

Prenatal Diagnosis 2012;32:927-932.

Los artículos serán referidos en el texto con su número romano.

Los artículos íntegros se han añadido al final de la tesis.

2. Agradecimientos

A la Dra. Carmen Comas Gabriel y al Dr. Bienvenido Puerto Navarro, directores de la tesis, por haber confiado en mí para llevar a cabo este proyecto y por haber facilitado y apoyado mi trabajo en todo momento.

A Nacho Rodríguez por todo su trabajo y apoyo. Muchas gracias.

Al Dr. Sabrià, Pau Castañeda y Hubert Hanssen por su paciencia y disponibilidad.

Al Dr. Carrera por despertar en mí el interés por la investigación.

A la Dra. Yeli Rodríguez por su amistad y cariño y porque siempre ha creído en mi.

A las Dras. Marga Torrents, Ana Muñoz y Mónica Echevarría compañeras y amigas del servicio de Medicina Fetal del Institut Universitari Dexeus, porque han sido mis maestras.

Al resto de compañeras del servicio de Medicina Fetal del Institut Universitari Dexeus Elena Scazzocchio, Sofía Fournier, Eva Meler, Ariana Serrano, Marta Ricart, Bea Lorente y Sonia Rombaut por todas las horas compartidas juntas.

A las enfermeras del servicio de Medicina Fetal del Institut Universitari Dexeus, Sussi, Vicky, Fanny, Jessica y Sandra, porque trabajar con ellas siempre ha sido muy fácil.

Al resto de médicos y residentes del Departamento de Obstetricia, Ginecología y Medicina de la Reproducción del Institut Universitari Dexeus por hacerme sentir en el Departamento como en casa.

Al Dr. Santi González, y sus hijos Santi, Hugo y Teo, por todo su cariño, tan necesario en los momentos difíciles.

A mis amigos Marina, Roberto, Nuri y José Luís, porque en los momentos de en los que creía que la tesis no sería posible, siempre supieron animarme.

A mis padres, Alfonso y Pilar, sin cuya ayuda y logística esto no hubiera sido posible, porque siempre están allí y porque todo lo que soy se lo debo a ellos.

A mi hermana Nuri, porque siempre me ha querido incondicionalmente.

A Grant por su paciencia, apoyo y amor.

A mi hija Alex, por darme la energía que necesitaba para llevar a cabo este proyecto.

3. Abreviaciones utilizadas en el texto

ACOG: American College of Obstetricians and Gynecologist

AFP: alfa fetoproteína

β -HCG libre: fracción beta libre de la gonadotropina coriónica humana

CIR: crecimiento intrauterino retardado

CRL: crown-rump length

EM: edad materna

EMA: edad materna avanzada

FIV: fecundación in vitro

FP: falsos positivos

GAM: generalized additive model

IC: intervalo de confianza

ICSI: inyección intracitoplasmática de esperma

IDESCAT: Institut d'Estadística de Catalunya

INE: Instituto Nacional de Estadística

IPDV: índice de pulsatilidad del ductus venoso

ISUOG: International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology

MoM: múltiples de la mediana

OSCAR: one stop clinics for assessment of risk

PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo

ROC: receiver operating characteristic

SD: síndrome de Down

SEGO: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia

TD: tasa de detección

TFP: tasa de falsos positivos

TN: translucencia nuchal

TRA: técnicas de reproducción asistida

TRAP: twin reverse arterial perfusión sequence

UE₃: estriol libre

VPN: valor predictivo negativo

VPP: valor predictivo positivo

4. Introducción

4.1 Prevalencia de las gestaciones múltiples

La tasa de gestaciones múltiples está en continuo aumento en los países desarrollados. Los gemelos constituyen hoy en día, del 3-4% de todos los nacimientos. (Imaizumi Y y col., 1997; Kogan MD y col., 2000; Blondel y col., 2002; Macfarlane y col., 2005; Ananth CV y col., 2005; Collins y col., 2007; Eriksson AW y col., 2007; Chauhan y col., 2010; Kallén B y col., 2010).

Revisando la literatura observamos que en USA, la tasa de gestaciones gemelares ha aumentado un 75%, aproximadamente: el número de embarazos múltiples aumentó de 68.339 (18.9 por 1000) en 1980 a 137.217 (33.2 por 1000) en 2009 (Kogan MD y col., 2000; Martin JA y col., 2011). Incrementos similares, se aprecian en otros países industrializados (Blondel B y col., 2002).

En España, la tasa de nacimientos múltiples se ha incrementado del 0.9% (5.974 gemelos) en 1970 al 2.06% (9.846 gemelos) en 2010. En los años 2009 y 2008, el número de nacimientos múltiples fue superior, de 10.113 y 10.201, respectivamente (datos facilitados por Instituto Nacional de Estadística, INE) (Tabla 1). En Cataluña, este incremento es muy similar: del 0.99% (978 gemelos) en 1970 al 2.06% (1.725 gemelos) en 2010, con picos máximos de nacimientos múltiples en los años 2008 y 2009 (1.728 y 1.813,

respectivamente)(datos facilitados por, Institut d'Estadística de Catalunya, IDESCAT) (Tabla 2).

Este incremento de los embarazos gemelares no puede atribuirse solamente a factores biológicos tales como la edad y la paridad; es evidente que debe haber otros factores que han influido de forma decisiva en este aumento.

La tasa de gemelares aumenta de forma significativa con la edad materna. A mayor edad, mayor probabilidad de gemelos espontáneos y mayor uso de TRA. La razón putativa por la que existe mayor tasa de gemelares espontáneos con EMA es que ante igual condición ovárica, las madres premenopáusicas de gemelos dizigotos presentan una hiperestimulación por FSH endógena causada por mecanismos neuroendocrinos, hipotalámicos o pituitarios (Lambalk CB y col., 1998). Sin tener en cuenta la causa, es importante destacar que, por ejemplo, en los Estados Unidos, entre 1980 y 2009, aunque la tasa de gemelares disminuyó un 13% (de 18.9 a 16.4 por 1000 nacimientos) en las mujeres menores de 20 años, las tasa de gemelaridad aumentó un 82%, 76%, 102%, 112% y 135%, entre las mujeres de edades 20-24, 25-29, 30-34, 35-39 y 40-44, respectivamente (Martin JA y col., 2010; Martin JA y col., 2011). Efectos similares se han observado en otros países como Inglaterra, Gales y Países Escandinavos (Eriksson AW y col., 2007). A pesar de esta fuerte asociación con la edad materna, no podemos olvidar que estos datos pueden ser falseados por el efecto que representan las TRA sobre la tasa de gemelares. Aun así, se ha estimado que la edad materna

es la responsable del 25-30% del incremento de la tasa de gemelaridad desde 1970 (Colins y col., 2007).

Respecto a las TRA, el análisis de los archivos de natalidad de los Estados Unidos y los registros de la Sociedad Americana de Reproducción Asistida (ASRM)/Sociedad para las Técnicas de Reproducción Asistida indican que entre 1998 y 2003 el número de gemelos nacidos consecuencia de TRA incrementó un 67% (Dickey RP, 2007). En el año 2006, se estima que las TRA fueron las responsables de aproximadamente un 1% de todos los nacimientos en los Estados Unidos y del 18% de todos los gemelos; de 54.566 niños nacidos consecuencia de TRA, 48% fueron gemelos (Chauhan SP, 2010). La introducción de ICSI (inyección intracitoplasmática de esperma) y las transferencias de embriones criopreservados, sin embargo, han supuesto un cambio en esta tendencia. Por otra parte, los embriones criopreservados se utilizan en el 25% de todos los ciclos de FIV. Debido al mayor uso de técnicas como la transferencia de un único embrión seleccionado (eSET) y el seguimiento de protocolos orientados a su prevención la tasa de gestaciones múltiples debidas a las TRA ha empezado a disminuir (Dickey RP, 2007; Luke y col., 2010).

Los datos disponibles demuestran que en los países desarrollados el número de gestaciones múltiples está en aumento en los últimos 25 años debido a la EM y TRA. El análisis de las causas hace prever que esta tendencia se va a mantener y probablemente aumentar en los próximos años.

Tabla 1. Evolución de los nacimientos y partos múltiples en España, 1990-2010 (datos facilitados por INE).

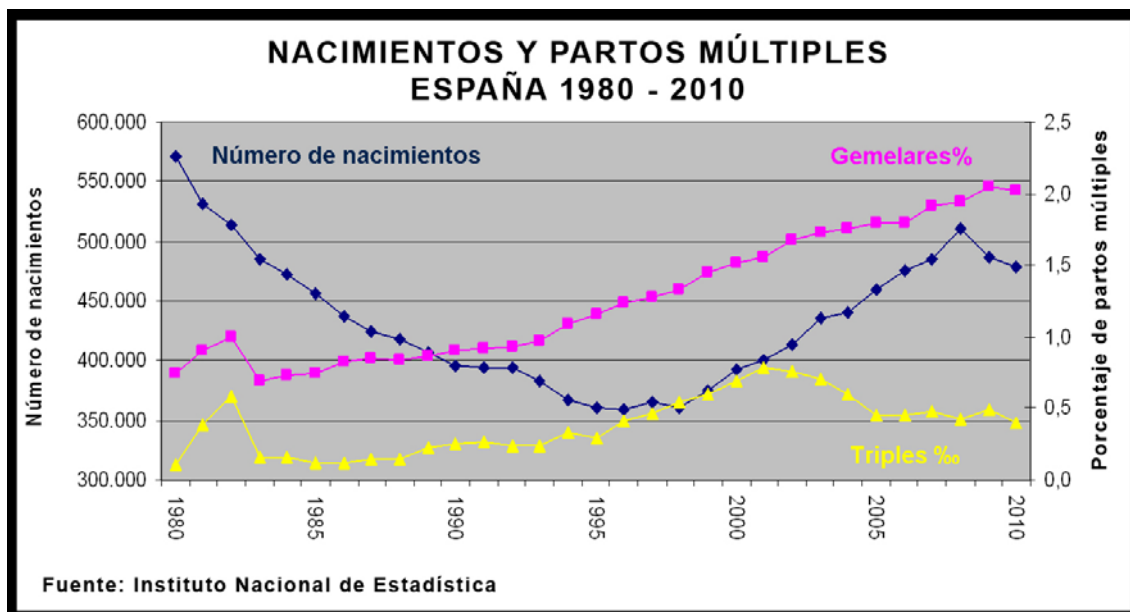
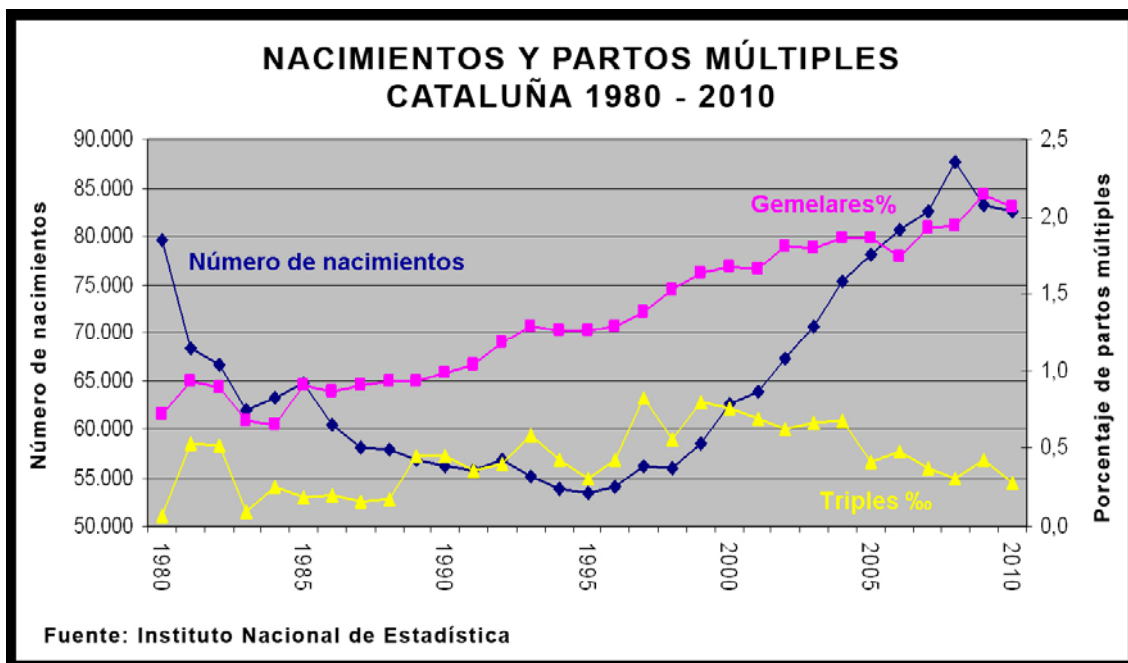


Tabla 2. Evolución de los nacimientos y partos múltiples en Catalunya, 1990-2010 (datos facilitados por IDESCAT).



4.2 Riesgo de aneuploidías en la gestación gemelar en función de la corionicidad

Tradicionalmente, la estimación del riesgo para aneuploidías se realizaba en base al criterio exclusivo de la edad materna. En gestaciones únicas, esta estimación del riesgo se ha redefinido con la introducción de marcadores ecográficos y la bioquímica materna de segundo y/o primer trimestre.

En las gestaciones múltiples, la evaluación del riesgo de aneuploidías es más complejo debido a diferentes factores. Definir “edad materna avanzada” en estas mujeres es complicado, no sólo porque existe más de un solo feto, sino porque la zigosis tiene un impacto en el riesgo. Al no disponer de métodos no invasivos para determinar la zigosis de la gestación gemelar, es imposible realizar un consejo exacto en este tipo de gestaciones. Además, la adición de los marcadores bioquímicos para la estimación de riesgo comporta dificultades, ya que es imposible determinar la contribución de cada feto.

La zigosis, y no la corionicidad, es lo que determina el riesgo de anomalías cromosómicas y si los fetos podrían ser concordantes o discordantes para tal anomalía.

En los gemelos monozigotos el riesgo de aneuploidía para cada feto es el mismo que en las gestaciones únicas, y normalmente los dos fetos se encuentran afectados. Existen, sin embargo, casos publicados de gemelos monozigotos discordantes para anomalías cromosómicas. En la mayoría de

estos casos, uno de los fetos presentaba un síndrome de Turner, y el otro un fenotipo masculino o femenino normal (Rogers y col., 1982; Dallapicola y col., 1985; Perlman y col., 1990). Estos casos son muy poco frecuentes, y realmente, no se consideran para el cálculo de riesgo de aneuploidía. En las gestaciones dizigotas el riesgo de aneuploidías de los fetos es dos veces superior al de una gestación única. El riesgo de que ambos fetos tengan un cariotipo anómalo es muy raro (el riesgo de un feto único al cuadrado).

En la práctica clínica, la zigosidad se infiere a partir de la corionicidad. La corionicidad se puede diagnosticar mediante ecografía en el primer trimestre de la gestación. Los indicadores ecográficos más fiables entre las 10 y 14 semanas gestacionales son la presencia de dos masas placentarias separadas, y en caso de una sola placenta, la presencia del signo lambda “λ” (sensibilidad del 97.4%, especificidad del 100%) para el diagnóstico de la bicorionicidad. Para la monocorionicidad, el signo definitivo es el signo “T” (100% sensibilidad, 98.2% especificidad)(Shetty y col., 2005; Wood y col., 1996; Sepúlveda y col., 1996, Carrol y col., 2002; Menon, 2005; Lee y col., 2006; Dias y col., 2011, Hassan y col., 2011). En la mayoría de los casos, todos los gemelos monocoriales son monozigotos. Aunque se han descrito casos de gestaciones gemelares dizigotas monocoriales, producto de TRA (Cleary-Goldman y col., 2005). Los gemelos bicoriales, en cambio si que pueden ser dizigotos o monozigotos, dependiendo del momento de la división del cigoto. En este caso la estimación de riesgo se generaliza porque aproximadamente, del 10-20% de las gestaciones bicoriales son monozigotas (Cleary-Goldman y Berkowitz, 2005).

Concluyendo, la información a los padres sobre el riesgo de aneuploidía de la gestación gemelar se debe basar en la corionicidad (Matias y col., 2005).

El incremento de la prevalencia de las gestaciones gemelares y el mayor riesgo de aneuploidías que suponen destacan la importancia de disponer de métodos de detección efectivos en el primer trimestre de gestación.

4.3 Estado actual del cribado en las gestaciones únicas

En los años 70 el único método de cribado de aneuploidías era la edad materna. Debido a la baja tasa de detección (TD)(30%), la recomendación de realizar una técnica invasiva para el diagnóstico de aneuploidías basada sólo en el riesgo por edad materna ya no es aplicable en nuestro medio (Protocolo de la SEGO, 2004; Protocols de la Generalitat de Catalunya, 2008).

La TD del cribado de aneuploidías se incrementó sustancialmente en la década de los 80 con la introducción del cribado mediante AFP (alfa fetoproteína) y β -HCG libre, UE₃ (estriol libre)(triple test) y inhibina A (cuádruple test), con TD del 60-65%, 65-70% y 70-75% respectivamente (Cuckle y col., 2005; Cuckle y Benn 2009; Wald y col., 2003).

Desde los años 90 el cribado de síndrome de Down se realiza en el primer trimestre, combinando marcadores ecográficos (translucencia nucal-TN-) y bioquímicos (β -HCG libre y PAPP-A). En las gestaciones únicas con síndrome de Down la concentración en suero materno de β -HCG libre es dos veces el doble de lo esperado y la concentración de PAPP-A se reduce a la mitad (Nicolaidis, 2011). El origen de estos marcadores bioquímicos es la placenta y su valor se ve influenciado por características maternas tales como el peso, raza, hábito tabáquico, método de concepción. Consecuentemente, para el cálculo del riesgo fetal de aneuploidía se tienen que tener en cuenta todas estas variables antes de calcular los MoM (múltiples de la mediana) de la β -HCG libre y PAPP-A (Kagan y col., 2008). En fetos euploides, el valor medio de

la β -HCG libre y PAPP-A es de 1.0 MoM. En fetos con síndrome de Down, el valor medio de la β -HCG libre es de 2.0 MoM y el de la PAPP-A de 0.5 MoM (Nicolaidis, 2011). La bioquímica de primer trimestre + edad materna como cribado para síndrome de Down tiene una TD del 65% con una tasa de falsos positivos (TFP) del 5% (Nicolaidis, 2011). La efectividad de este test es mejor entre las 8-10 semanas ya que la diferencia entre los niveles de PAPP-A entre los fetos euploides y aneuploides es mayor al principio de la gestación (Cuckle y van Lith, 1999; Kagan y col., 2008; Wrigth y col., 2010). Aunque la diferencia en los niveles de β -HCG libre es mayor entre fetos euploides y aneuploides a medida que avanza la gestación, la magnitud de esta diferencia es menor que la de la PAPP-A.

En 1866 Langdon Down describió que los niños con síndrome de Down tenían un tejido cutáneo más grueso que los niños euploides (Langdon Down, 1866). En la década de los 90 se objetivó que este exceso de piel podía observarse ecográficamente mediante un acúmulo de líquido en el tejido subcutáneo de la nuca (TN aumentada) (Nicolaidis y col., 1992). En los últimos 20 años múltiples estudios han demostrado que el cribado de aneuploidías mediante la TN en el primer trimestre es efectivo (Snijders y col., 1998; Wald y col., 2003; Nicolaidis, 2004; Malone y col., 2005). Además, la TN aumentada se asocia con malformaciones cardíacas y desórdenes genéticos (Hyett y col., 1996; Souka y col., 1998; Souka y col., 2005). La edad óptima para medir la TN es entre las 11 y las 13+6 días semanas de gestación, con un CRL (crown rump length) mínima de 45 mm y máxima de 84 mm. La TN aumenta con el CRL, por lo que es imprescindible tener en cuenta el CRL para determinar si una TN está

aumentada o no. Para una TFP del 5%, el cribado de aneuploidías en primer trimestre mediante TN detecta del 75-80% de los fetos con síndrome de Down (Nicolaidis, 2004).

No existe ninguna relación entre la medida de la TN y los niveles séricos de β -HCG libre y PAPP-A, ni en fetos euploides ni en fetos afectados con síndrome de Down. Por ello, estos marcadores pueden combinarse para aumentar la efectividad del cribado de primer trimestre (Brizot y col., 1994; Brizot y col., 1995; Noble y col., 1995; Spencer y col., 1999). Múltiples estudios prospectivos en miles de gestaciones únicas han demostrado que para una TFP del 5%, el test combinado de primer trimestre (edad materna+TN+ β -HCG libre+PAPP-A) tiene una TD del 90% para síndrome de Down (Krantz y col., 2000; Bindra y col., 2002; Schuchter y col., 2002; Spencer y col., 2003; Wapner y col., 2003; Nicolaidis y col., 2005; Ekelund y col., 2008; Kagan y col., 2009; Leung y col., 2009). El test combinado puede realizarse siguiendo diferentes estrategias: extracción sanguínea y exploración ecográfica en el mismo día (OSCAR-one stop clinics for assessment of risk)(Bindra y col., 2002) o extracción sanguínea precoz (8-10 semanas) y exploración ecográfica a las 11-13+6 semanas (Borrell y col., 2004; Wright y col., 2010). Se estima que realizar el estudio en dos tiempos mejora la TD del 90% al 93-94% (Nicolaidis, 2011). Una tercera opción sería realizar extracción sanguínea a las 9 semanas para el estudio de la PAPP-A y exploración ecográfica con nueva extracción sanguínea a las 12 semanas para el estudio de la β -HCG libre. Con esta estrategia, la TD mejoraría hasta el 95% (Nicolaidis, 2011).

En la última década se han propuesto nuevos marcadores ecográficos para mejorar la sensibilidad del cribado de síndrome de Down en gestaciones únicas: hueso nasal ausente, regurgitación tricuspídea, onda a reversa en el ductus venoso. La ausencia de hueso nasal, la onda a reversa en el ductus venoso y la regurgitación tricuspídea se encuentran en el 60, 66 y 55% de los fetos con síndrome de Down y en el 2.5, 3 y 1% de los fetos euploides, respectivamente (Matias y col., 1998; Cicero y col., 2001; Cicero y col 2006; Huggon y col., 2003; Nicolaidis, 2004; Faiola y col., 2005; Falcon y col., 2006; Kagan y col., 2009; Maiz y col., 2009). La incorporación de estos marcadores al test combinado mejora la TD hasta el 93-96% y disminuye la TFP al 2.5% (Kagan y col., 2009; Maiz y col., 2009). Otra estrategia podría ser incorporar estos marcadores dentro de un cribado contingente (Nicolaidis, 2011). Mediante esta estrategia el test combinado (edad materna+TN+ β -HCG +PAPP-A) se realizaría a todas las pacientes. Las pacientes con un riesgo de 1/50 serían consideradas con riesgo de aneuploidía fetal y se les ofrecería la posibilidad de realizar una técnica invasiva. Las pacientes con un riesgo de 1/1000 o menor serían consideradas de bajo riesgo. A las pacientes con riesgo intermedio 1/51-1/1000 (aproximadamente un 15% de la población), se les ofrecería un segundo nivel de cribado con el estudio del hueso nasal, regurgitación tricuspídea u onda a en ductus venoso. Su riesgo se vería modificado por estos marcadores secundarios. En este segundo término, las pacientes con un riesgo mayor a 1/100 serían consideradas con riesgo de aneuploidía fetal y las pacientes con un riesgo inferior a 1/100 serían consideradas de bajo riesgo.

Últimamente se han sugerido nuevos marcador adicionales para el cribado de síndrome de Down: el estudio de la arteria hepática fetal (Zvanca y col., 2011), ángulo frontomaxilar (Borenstein y col., 2007), ángulo pélvico (Belics y col., 2011).

El cribado de aneuploidías de primer trimestre en gestaciones únicas más efectivo es la combinación de edad materna, marcadores bioquímicos y múltiples marcadores ecográficos. La TD es del 95% con una TFP del 2.5%. Estas TD se consiguen tanto en los casos en los que se realiza un test combinado único, o un test contingente con el estudio de marcadores bioquímicos o marcadores ecográficos adicionales en un segundo término.

4.4 Aspectos específicos del cribado y diagnóstico de aneuploidías en la gestación gemelar. Importancia del problema

Los gemelos representan una problemática singular en el diagnóstico prenatal. No pueden aplicarse los mismos test de cribado para únicos y gemelares, ya que en las gestaciones gemelares han de tenerse en cuenta factores no presentes en las gestaciones únicas.

El cribado de anomalías cromosómicas en las gestaciones múltiples presenta serios dilemas clínicos, éticos y morales que merecen cierta consideración:

- Los métodos de cribado efectivos en las gestaciones únicas, tales como el estudio de parámetros bioquímicos en sangre materna, son más difíciles de aplicar e interpretar en las gestaciones múltiples y, además, poseen tasas de detección muy bajas (Matias y col., 2005).
- En el caso de un cribado “positivo”, muchas veces, no sabemos cual de los fetos es el de riesgo (Matias y col., 2005).
- Se realizan mayor número de procedimientos invasivos en las gestaciones múltiples. Sin embargo, a veces, es problemático identificar la procedencia del tejido fetal extraído (Weisz y Rodeck, 2005).
- Existe mayor riesgo de pérdida fetal (Weisz y Rodeck, 2005).
- Respecto a la elección del procedimiento invasivo, parece ser que la biopsia corial sería la técnica de elección porque ofrece un diagnóstico más precoz y la posibilidad de realizar una reducción selectiva temprana. Algunos autores han descrito que la práctica de reducciones

fetales precoces se asocia con una menor tasa de pérdida fetal (Evans y col., 2005; Brandenburg y col., 1994). Sin embargo, existen pocos estudios que comparen la efectividad de la amniocentesis y biopsia corial en gemelares (Audibert y col., 2011).

- El manejo de las gestaciones con un feto con anomalía cromosómica es difícil, y las técnicas de reducción fetal selectiva presentan un riesgo elevado para el gemelo no afecto (Stone y col., 2008).

4.5 Factores determinantes de la estimación del riesgo en el primer trimestre en gestaciones gemelares

4.5.1 Edad materna avanzada

El riesgo de aneuploidía se asocia con EMA (Cleary-Goldman y col., 2005). Clásicamente se ha considerado EMA cuando la madre tiene una edad igual o superior a los 35 años en el momento del parto. El riesgo de síndrome de Down en una paciente de 35 años (1/270) es casi el mismo que el riesgo de pérdida fetal por la práctica de una amniocentesis. Por ello, se estableció como punto de corte los 35 años como indicación de amniocentesis por EMA (Odibo y col., 2003; Resta y col., 2005). Por supuesto, éste es un criterio totalmente arbitrario. En los casos de gestaciones monocoriales, la designación de EMA es la misma que en gestaciones únicas. Sin embargo, definir EMA en gestaciones dizigotas, trillizos o gestaciones de mayor orden es mucho más complejo. En gemelos dizigotos, el riesgo de que uno de los fetos presente una aneuploidía, es el doble que el de una mujer de la misma edad embarazada de una gestación única (Odibo y col., 2003).

Si la edad es utilizada como único parámetro para ofrecer una técnica invasiva en los casos de gestaciones bicoriales, encontramos en la literatura un amplio rango de edades maternas en las cuales ofrecer el procedimiento invasivo (Odibo y col., 2003; ACOG practice bulletin, 2004). Rodis y Meyers (Rodis y col., 1990; Meyers y col., 1997) publicaron diferentes fórmulas para calcular el riesgo de aneuploidía en gestaciones gemelares dizigotas y monozigotas.

Concluyeron que a la edad de 31 años una mujer embarazada de gemelos con zigosidad desconocida, tiene el mismo riesgo de aneuploidía que una mujer de 35 años embarazada de una gestación única. Estos autores sugieren ofrecer una técnica invasiva a todas las pacientes embarazadas de gemelos a partir de 31 años. Sin embargo, esta recomendación no puede aplicarse actualmente por las siguientes razones (Audibert y col., 2007):

1. El riesgo de pérdida fetal por técnica invasiva en gemelos es mayor que en únicos (Agarwal y col., 2011; Vink y col. 2012).
2. Esta aproximación no es válida para gestaciones monocoriales, ya que presentan el mismo riesgo que las gestaciones únicas.
3. La recomendación de realizar una técnica invasiva para el diagnóstico de aneuploidías basada sólo en el riesgo por edad materna ya no es aplicable en nuestro medio (Protocolo de la SEGO, 2004; Protocols de la Generalitat de Catalunya, 2008).

La EMA como criterio único ya no es un método de cribado de aneuploidías ni en gestaciones únicas ni en las gestaciones múltiples.

4.5.2 Translucencia nucal (TN)

El cribado mediante TN presenta una tasa de detección de síndrome de Down bastante similar en gestaciones únicas y gemelos (Cleary-Goldman y col., 2005a; Cleary-Goldman y col., 2005b; Sebire y col., 1996). Respecto a la técnica de la medida de la TN, resaltar que la distribución de la TN no difiere entre fetos únicos y gemelares. Otro factor importante es que el cribado mediante TN presenta la ventaja de ser feto específico. Por ello la medida de la TN es método más utilizado para el cribado de aneuploidías en las gestaciones múltiples (Nicolaidis K, 2011; Summers y col., 2007).

La estimación de riesgo se puede realizar para cada feto o para los dos conjuntamente. En los gemelos monocoriales, los dos fetos tienen el mismo riesgo de síndrome de Down, por lo que el riesgo global es el mismo que en las gestaciones únicas. En el caso de las gestaciones monocoriales, se tiende a calcular la media de las TN de los dos fetos y proporcionar un único riesgo para los dos fetos (Sebire y col., 1996). En las gestaciones bicoriales, cada feto se considera a parte. Cada feto tiene un riesgo independiente, y mediante la TN individual de cada feto podemos calcular su riesgo específico. Aproximadamente, un 10% de las gestaciones bicoriales son monozigotas y el riesgo tendría que calcularse como tal. Sin embargo, esta pequeña variación en el cálculo de riesgo no parece afectar a la precisión de los cálculos poblacionales. Se aconseja también calcular el riesgo por gestación, ya que en caso de que uno de los fetos esté afecto y se practique una técnica invasiva, se

suelen tomar una muestra de cada feto y no solamente del presuntamente afecto.

Mediante TN y edad materna, Sebire y colaboradores (Sebire y col., 1996) calcularon el riesgo de síndrome de Down para cada feto en 448 gestaciones múltiples. La TD fue del 88% y la de TFP del 7.3%. Cabe destacar que la tasa de TN incrementada fue mayor en las gestaciones monocoriales que en las bicoriales (8.4% versus 5.4%). Este dato sugiere que la presencia de TN elevada puede ser un signo temprano de transfusión feto fetal (TFF) (Sebire y col., 1997; Sebire y col., 2000). Por ello, el cálculo de riesgo de síndrome de Down en gestaciones monocoriales requiere consideraciones especiales. En un estudio con 769 fetos monocoriales, Vandecruys describen que el mejor método para el cálculo de riesgo de síndrome de Down en las gestaciones monocoriales es la media de las TN. Mediante este cálculo, los autores consiguen una sensibilidad del 100% con una TFP del 4.2% (Vandecruys y col., 2005). En la tabla 3 se describen los resultados de las diferentes series publicadas sobre el cribado de primer trimestre de aneuploidías mediante TN en gestaciones múltiples.

El cribado de primer trimestre mediante TN es el método más utilizado en las gestaciones múltiples. Nos proporciona un riesgo feto específico, con elevadas TD. Sin embargo, la TFP es demasiado alta, lo que conlleva una elevada demanda de técnicas invasivas.

Tabla 3. Cribado de primer trimestre de aneuploidías mediante TN y edad materna en gestaciones múltiples. Revisión de la literatura.

	<i>Cut-off</i>	N (n° de gestaciones gemelares/fetos con T21)	TD para T21, %	TFP, %
Sebire y col ., 1996	1/300	448/8	88	5 (feto), 10 (gestación-BC), 13 (gestación-MC)
Spencer, 2000		159/ND*	75.2	5
Maymon y col ., 2001		174/2	100	9
Spencer & Nicolaides, 2003	1/300	230/4	75	6.8 (feto), 9.2 (gestación)
Wald y col ., 2003	ND*	ND*	73 (BC) 68 (MC) 69 (todos)	
Vandercruys y col ., 2005	1/300	769/6	100	4.2 (solo MC)
Gonce y col ., 2005	1/250	100/3	100	8.6 (feto) 14.3 (gestación)
Chasen y col ., 2007	1/130	535/7	83	5
	1/300		100	11.2

*TD: tasa de detección; TFP: tasa de falsos positivos; T21: trisomía 21; BC: bicorial; MC: monocorial; ND: datos no disponibles; *: datos modulados; N: número de casos; cut off: dintel de corte.*

4.5.3 El test combinado. Estado actual

La utilización de los marcadores bioquímicos (β -HCG libre y PAPP-A) para el cálculo de riesgo de síndrome de Down en las gestaciones múltiples comporta serias limitaciones debidas a que ambos tienen origen placentario. En primer lugar, se estima que en las gestaciones gemelares los niveles séricos de estas hormonas son aproximadamente el doble que en las gestaciones únicas, pero aun así hay amplias variaciones según diferentes estudios (Audibert y col., 2011). La distribución de los marcadores bioquímicos en las gestaciones gemelares afectas de síndrome de Down no se conoce con certeza y en muchos casos se calculan pseudo-riesgos en lugar de riesgos específicos basados en datos poblacionales amplios (Wald y col., 2005). En segundo lugar, la interpretación de los marcadores alterados es muy difícil, ya que los valores del feto afecto pueden quedar enmascarados por los del feto sano. En tercer lugar, tampoco queda claro el papel de la zigosidad sobre el cálculo de riesgo de aneuploidía y los valores bioquímicos.

El cribado basado exclusivamente en parámetros bioquímicos en sangre materna no es un método válido en las gestaciones múltiples. La placenta es el origen de estos marcadores por lo que no son feto específicos. En caso de un gemelo afecto, sus valores séricos quedan enmascarados por los del feto sano. Las TD y TFP resultante en este cribado no son adecuadas.

Teniendo en cuenta que el cribado de aneuploidías mediante la bioquímica materna aislada en gemelares no puede identificar el feto afecto, en el caso de

gemelos discordantes para el diagnóstico de síndrome de Down, parece razonable el plantear la estrategia de combinar los marcadores séricos con la TN que ofrece un riesgo feto específico (Spencer, 2000). Se dispone de mucha experiencia en la combinación de edad materna, TN fetal, β -HCG libre y PAPP-A en suero materno, conocida como test combinado, para el cribado de síndrome de Down en las gestaciones únicas. En el apartado 1.3 de esta tesis doctoral ya se ha discutido ampliamente el estado actual del cribado en las gestaciones únicas. Sin embargo, a pesar de sus excelentes resultados en únicos, su aplicación en gestaciones múltiples presenta ciertas dificultades (Spencer, 2000; Spencer y Nicolaidis, 2003). No existen muchas series publicadas sobre el rendimiento del test combinado en las gestaciones múltiples. (Goncé y col., 2008; Chasen y col., 2007; Goncé y col., 2005; Spencer y col., 2003; Orladi y col., 2002) (Tabla 4). Este dato nos da una idea de la escasa utilización del test combinado en múltiples. Todas las series presentan un número bajo de fetos con síndrome de Down (máximo 7), y la serie incluida en esta tesis es la segunda con más gestaciones gemelares reclutadas. Las series publicadas demuestran que el test combinado tiene una tasa de detección elevada, similar a la del cribado mediante TN. Sin embargo, diferentes autores plantean problemas que requieren una solución antes de aplicar el test combinado como cribado universal en los gemelares: el papel de las TRA en los valores de la bioquímica, la necesidad de considerar la corionicidad como un factor de corrección, o, incluso, el valor del cribado en los casos de TN normales en ambos fetos. El planteamiento de esta tesis doctoral está dirigido a poder responder a estas preguntas y será discutido en el siguiente capítulo “Planteamiento del problema y justificación de la tesis”.

La experiencia actual en la aplicación del test combinado en las gestaciones múltiples es limitada y es el objetivo de la presente tesis. Los trabajos incluidos en esta tesis se proponen demostrar que el test combinado mejora la efectividad de otras opciones disponibles en gestaciones gemelares y además proporcionaría un riesgo específico para cada feto. Todos estos puntos serán ampliamente discutidos en los siguientes apartados.

El cribado de primer trimestre en gestaciones múltiples se realiza mediante TN. Este cribado presenta altas TD pero una TFP excesivamente elevada. Es necesario introducir un nuevo test que mantenga la TD, pero que disminuya la TFP y la acerque a la de las gestaciones únicas. El test combinado (edad materna+TN+ β -HCG libre y PAPP-A en sangre materna) se postularía como la alternativa posible. Sin embargo, existen todavía problemas no resueltos para su implementación universal: el papel de TRA en el valor de la bioquímica, el impacto de la corionicidad en el resultado del cribado...Para poder aclarar estos puntos el doctorando ha diseñado esta tesis doctoral. El poder aportar una respuesta a los diferentes dilemas que hoy por hoy presenta el test combinado tendría gran relevancia clínica.

Tabla 4. Efectividad del test combinado en las gestaciones múltiples.**Revisión de la literatura.**

	N	>35 años (%)	EG media en el momento de extracción (días)	N T21	Mediana B-hCG MoM (no afectados)	Mediana PAPP-A MoM (no afectados)	Mediana TN MoM (no afectados)	TFP (%) (por feto)	TD (%)
Goncé y col., 2008 ⁶	161	15 (>37)	77	4	1.72	2.01	1.05	3.5	100
Chasen y col., 2007 ⁷	519	46.5	-	7	0.97	1.12	-	7	100
Goncé y col., 2005 ⁸	100	36 (>34)	77	3	1.57	1.96	1.02	3.6	100
Spencer y col., 2003 ⁹	206	-	85	4	2.15	1.93	-	6.9	75
Orlandi y col., 2002 ^{*10}	30	-	84	7	1.72	1.61	0.9	10.6	-
Estudio II	447	30.6 %	67.2 BC/70.7 MC	2	1.74 BC/1.44 MC	1.72 BC/1.51 MC	0.97 BC/0.98MC	5.7 BC/4.4MC	100

* gestaciones múltiples concebidas mediante TRA

BC: bicorial; MC: monocorial; TFP: tasa de falsos positivos; TD: Tasa de detección; EG: edad gestacional; MoM: múltiples de la mediana; N: numero de casos; TN: translucencia nucal; B-hCG: fracción beta libre de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; T21: trisomía 21.

5. Planteamiento del problema.

Justificación de la tesis

Las gestaciones gemelares representan entre un 3-4% de todas las gestaciones. El desarrollo de un cribado de primer trimestre que aportara un riesgo individual para cada feto y que mejorara la efectividad de los test previos es una prioridad para este grupo de pacientes. Como ya se ha comentado previamente, la práctica de técnicas invasivas en estas pacientes es mucho más costosa y difícil, y las complicaciones pueden ser graves y afectar al gemelo no afecto de aneuploidía.

Hasta la fecha, el cribado con TN es el método más utilizado en las gestaciones múltiples. Incluso, la SEGO, en sus protocolos reconoce como el test de cribado de primer trimestre de elección para las gestaciones múltiples la TN (Protocolos de la SEGO, última actualización 2004). Es cierto, que la TN posee unas altas TD. Sin embargo, la TFP es demasiado alta (Sebire y col., 1996; Maymon y col., 2001; Spencer y Nicolaides, 2003; Goncé y col., 2005; Prats y col., 2008). Chasen y col., publican en 2007, una serie de 535 gestaciones gemelares donde el resultado del cribado de aneuploidías mediante TN presentaba una TD del 100%, con una TFP del 11.2% (Chasen y col., 2007).

La solución al problema podría ser añadir los valores de la bioquímica del primer trimestre a la TN y realizar el test combinado. Como ya se ha

comentado, este test es el de elección en las gestaciones únicas (Nicolaidis, 2011).

Sin embargo, añadir los valores de bioquímica materna al cribado mediante TN y realizar un test combinado (edad materna, TN, β -HCG libre y PAPP-A) en la gestación gemelar presenta problemas que deben ser resueltos. Para poder realizar el test combinado en gestaciones gemelares es necesario conocer la distribución natural del la β -HCG libre y PAPP-A en sangre materna en gemelos. Sólo si conocemos su distribución, tanto en condiciones de normalidad como de patología, podremos aplicar los factores de corrección necesarios para conseguir un test de cribado lo más exacto posible. Además, estas curvas se tienen que desarrollar según la corionicidad de la gestación múltiple. Así pues, son necesarias curvas para las gestaciones bicoriales y curvas para las gestaciones monocoriales (Spencer, 2001; Linskens y col., 2009; Spencer, 2008; Koster y col., 2010; Madsen y col., 2011) . De esta manera podremos conocer si la corionicidad representa otro factor de corrección en el momento de la aplicación del test en gemelos.

Existen escasas series en la literatura sobre la aplicación del test combinado en las gestaciones múltiples y el número de gestaciones múltiples incluidas en estos estudios no es muy amplio (Goncé y col., 2008; Chasen y col., 2007; Goncé y col., 2005; Spencer y Nicolaidis, 2003; Orlandi y col., 2002). Como ya he comentado anteriormente, estos autores plantean diferentes problemas que requieren una solución antes de poder proponer al test combinado como el cribado de aneuploidías de primer trimestre de elección en los gemelares (el

impacto de las TRA, de la corionicidad, etc). Debido a estos interrogantes no resueltos no se ha establecido todavía un consenso universal para su aplicación en gestaciones múltiples.

Existe, según el parecer del doctorando, un cierto vacío no resuelto en el cribado de primer trimestre en las gestaciones múltiples. Porque, aunque sí que es cierto que la TN es un test aceptable, la elevada TFP del mismo requiere seguir investigando para conseguir un test mucho más preciso, con TFP cercanas a las de las gestaciones únicas. Creo que esto es una demanda tanto de nuestras pacientes como de nuestro sistema sanitario: una TFP excesivamente alta conlleva mayor número de técnicas invasivas que comportan, por un lado mayor riesgo de pérdida fetal y por otro, mayor coste sanitario.

Por todo ello el doctorando cree justificado el desarrollo de una tesis doctoral sobre el cribado de aneuploidías de primer trimestre en gestaciones múltiples. Esta tesis pretende responder las dudas que todavía presenta el test combinado en las gestaciones múltiples como el papel de la TRA en el valor de los marcadores bioquímicos, la corionicidad como factor de corrección o la necesidad de conseguir una TFP lo más cercana a la de las gestaciones múltiples posible. El doctorando aportaría una mayor casuística que la previamente publicada referida casi en exclusiva a la población caucásica propia de nuestro entorno. Además, esta tesis propone la incorporación de nuevos factores de corrección como la corionicidad y TRA, que podrían mejorar la efectividad del test. El objetivo de esta tesis doctoral sería conseguir aportar

datos que podrían confirmar al test combinado como el nuevo test de elección para el cribado de aneuploidías de primer trimestre en las gestaciones múltiples.

A partir de toda esta información previa se plantea esta tesis doctoral cuya hipótesis y objetivos específicos se describen a continuación.

Existe un cierto vacío no resuelto en el cribado de primer trimestre en las gestaciones múltiples. Esta tesis doctoral plantea la introducción del test combinado como método de cribado de elección para las gestaciones gemelares. Según los resultados de esta tesis, este test podría ser el ideal ya que mejoraría la efectividad de los métodos previos y nos proporcionaría un riesgo feto-específico. La incorporación del factor de corrección por corionicidad como propone la tesis, facilitaría realizar un cálculo de riesgo según el tipo de gestación gemelar. Si los resultados son los esperados, el doctorando querría destacar la aplicabilidad clínica del trabajo realizado: en caso de que se confirmara la hipótesis planteada en la tesis podríamos plantear un cambio en la estrategia de cribado en la gestación gemelar y ello representaría un avance importante en la práctica clínica.

6. Hipótesis de trabajo

Se plantea la siguiente hipótesis que es desarrollada en las publicaciones en las que se basa la tesis doctoral:

La incorporación del test combinado mejora la estimación del riesgo individual de síndrome de Down y reduce la TFP en gestaciones múltiples, en comparación con el cribado actual basado exclusivamente en la EM y la TN. Los marcadores bioquímicos β -HCG libre y PAPP-A presentan una distribución distinta según la corionicidad de la gestación múltiple.

La introducción de un factor corrector en base al método de concepción (espontáneo o mediante técnicas de reproducción asistida) mejora la efectividad en la estimación del riesgo de síndrome de Down en las gestaciones gemelares.

El test combinado precoz, incluyendo la EM, los parámetros bioquímicos PAPP-A y β -HCG libre y la TN, representa el método de elección actual de cribado de síndrome de Down en las gestaciones gemelares.

7. Objetivos de estudio

El objetivo principal de esta tesis doctoral es:

“Proponer un método de cribado combinado temprano de síndrome de Down en gestaciones gemelares que mejore la sensibilidad y especificidad de los métodos actuales”.

Este objetivo principal se divide en los diferentes objetivos secundarios:

1. Analizar los marcadores bioquímicos en gestaciones múltiples y determinar:
 - a) Valores de referencia.
 - b) Relación con la corionicidad.
 - c) Comparación con valores de referencia en gestaciones únicas.
2. Analizar la translucencia nugal en gestaciones múltiples y determinar:
 - a) Valores de referencia.
 - b) Relación con la corionicidad.
 - c) Comparación con valores de referencia en gestaciones únicas.
3. Evaluar diferentes estrategias de cribado en gestaciones múltiples y determinar:
 - a) Efectividad del cribado combinado temprano.
 - b) Factores de corrección por corionicidad y TRA.
 - c) Comparación con gestaciones únicas.
 - d) Comparación de estrategias de cribado en gestaciones múltiples.

8. Material y métodos

Para la realización de esta tesis se han realizado dos estudios.

8.1 Estudio I

El estudio I determina los valores de referencia de PAPP-A y β -HCG libre en el primer trimestre de la gestación según la corionicidad de la gestación gemelar y analiza la evolución de estos valores según la edad gestacional.

Diseño del estudio

Estudio prospectivo y observacional.

Población a estudio

Se incluyeron 8.592 gestaciones únicas y 279 múltiples. Entre las 279 gestaciones múltiples 250 son bicoriales (89.6%) y 29 (10.4%) monocoriales.

Los criterios de exclusión son: pacientes con datos incompletos o con un seguimiento insuficiente, fetos aneuploides.

Cribado de aneuploidía

Tanto a las gestaciones únicas como a los gemelares se les ofreció el mismo test de screening para síndrome de Down: el test combinado. Este test estudia

datos bioquímicos y ecográficos. En todos los casos entre las 8 y la 13+6 semanas se obtuvo sangre materna para la determinación de β -HCG libre y PAPP-A. Los valores séricos fueron analizados mediante Kryptor (BRAHMS®, Berlín, Alemania). La ecografía se realizó entre las 11-13+6 semanas de gestación.

Para calcular el riesgo de cada gestación se utilizó el software SsdwLab5.

Análisis estadístico

Las características de las pacientes de las gestaciones monocoriales y bicoriales se presentaron como media \pm desviación típica y en porcentajes (%) y se utilizaron las pruebas de *t*-student y χ^2 de Pearson para comparar sus distribuciones. Para comparar el valor de los marcadores bioquímicos en las gestaciones monocoriales y bicoriales se utilizó la prueba de *U*- Mann-Whitney en los MoM no transformados y la prueba *t*- student en el casos de los MoM log transformados.

Todas los test fueron bilaterales con un nivel significación $\alpha=0.05$.

Para comparar la distribución de los marcadores bioquímicos se utilizó un modelo GAM (generalized additive model) ajustado a un modelo de regresión suave con los valores transformados a logaritmo de base 10” usando el software R (generalized additive model-smoothing spline regression)(R Development Core Team, 2008; CBMS-NSF, 1990; Hastie y Tibshirani, 1990). Los modelos aditivos generalizados son una generalización de los modelos

lineales y lineales generalizados. Su mayor ventaja es que permite que las variables dependientes no se distribuyan normalmente. Los predictores tampoco son lineales sino funciones paramétricas. Por ello mediante los modelos aditivos generalizados podemos ajustar modelos de regresión lineal suaves. Los resultados de este análisis se expresan gráficamente.

8.2 Estudio II

El estudio II analiza los valores de referencia de los marcadores hormonales y de la TN en gestaciones gemelares y únicos y estudia la influencia de la TRA en los marcadores de primer trimestre para determinar la efectividad del test combinado en las gestaciones gemelares y compararla con la de las gestaciones únicas en nuestra población.

Diseño del estudio

Estudio prospectivo y observacional.

Población a estudio

Se incluyen 894 fetos gemelares y 9.868 fetos únicos. Entre las gestaciones múltiples, 402 (89.9%) fueron bicoriales y 45 (10.1%) monocoriales. Se diagnostican 2 casos de síndrome de Down.

Los criterios de exclusión son: pacientes con datos incompletos o con un seguimiento insuficiente. Se excluyen 44 pacientes del estudio (0.4%).

Cribado de aneuploidía

Tanto a las gestaciones únicas como a los gemelares se les ofreció el mismo test de screening para trisomía 21: el test combinado. Este test estudia datos bioquímicos y ecográficos. En todos los casos, entre las 8 y las 13+6 semanas se obtuvo sangre materna para la determinación de β -HCG libre y PAPP-A. Los

valores séricos fueron analizados mediante Kryptor (BRAHMS®, Berlín, Alemania). La ecografía se realizó entre las 11-13+6 semanas de gestación. Se midió la longitud cráneo caudal (CRL) , la TN y el índice de pulsatilidad del ductus venoso (IPDV) de cada feto siguiendo las recomendaciones de la Fetal Medicine Foundation (Nicolaidis y col., 1994; Maiz y col., 2008).

Para calcular el riesgo de cada gestación se utilizó el software SsdwLab5.

Análisis estadístico

Las variables continuas se compararon mediante la prueba ANOVA o la prueba de Kruskal-Wallis según cumplieran las asunciones de normalidad y de igualdad de varianzas. Las variables categóricas fueron comparadas con la prueba del χ^2 de Pearson.

Todas los test fueron bilaterales con un nivel significación $\alpha=0.05$. Los resultados de las pruebas fueron expresados como TD, especificidad, TFP, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). Las TFP fueron comparadas usando el 95% de intervalo de confianza (IC).

Las estrategias de cribado para únicos y bicoriales fueron comparadas utilizando el área bajo la curva ROC (receiver operating characteristic) y su correspondiente intervalo de confianza.

9. Resultados

9.1 Estudio I

El estudio I determina los valores de referencia de PAPP-A y β -HCG libre en el primer trimestre de la gestación según la corionicidad de la gestación gemelar y analiza la evolución de estos valores según la edad gestacional.

En la tabla 5 se resumen las características poblacionales de las mismas. A destacar que la extracción sanguínea para la determinación de β -HCG libre y PAPP-A se realizó significativamente antes en las gestaciones bicoriales (64.5640 versus 68.1379, prueba de *U* Mann–Whitney , $p = 0.008$) y que la medición del CRL era menor en los gemelos monocoriales (64.19mm versus 59.03, prueba de *U* Mann-Whitney, $p= 0.021$).

Se identificaron dos casos de trisomía 21 en dos gestaciones bicoriales distintas. En el primer caso, la edad materna era de 38 años y el feto afecto presentaba una TN 2.6 mm, CRL 51mm, la concentración de β -HCG libre a las 8 semanas era de 26, 85 mU/L, 1.4 MoM corregidos y PAPP-A fue de 301 ng/mL y 0.93 MoM corregidos. En el segundo caso, la edad materna era de 37 años y el feto afecto presentaba una TN 3.2mm, CRL 72 mm, la concentración de β -hCG libre a las 8 semanas era de 120.89 mU/L, 1.52 MoM corregidos y PAPP-A fue de 219.05 ng/mL y 0.79 MoM corregidos.

En la tabla 6 se muestran las medianas de los MoM corregidos de β -HCG libre y PAPP-A, tanto en gestaciones monocoriales como en bicoriales y en únicas. Se comparan estos datos con los de las gestaciones únicas para validar los resultados en las gestaciones múltiples. Existen diferencias significativas en los MoM corregidos de β -HCG libre entre monocoriales y bicoriales, pero no en los valores de PAPP-A. La figura 1 representa la distribución de la β -HCG libre y PAPP-A en gestaciones únicas en nuestra población.

Los MoMs corregidos log transformados para β -HCG libre fueron de 0.2644 y 0.1595 en gestaciones bicoriales y monocoriales, respectivamente ($p=0.017$). El valor de la PAPP-A fue de 0.2398 en bicoriales and 0.1697 en monocoriales ($p = 0.166$).

El doctorando utilizó un modelo aditivo generalizado (GAM) para determinar si los valores bioquímicos diferían dependiendo del tipo de placentación. Las figuras 2 y 3 representan gráficamente la relación entre la concentración de β -hCG libre y PAPP-A y la edad gestacional en días, para gestaciones gemelares monocoriales y bicoriales, ajustadas por peso.

Mediante el modelo GAM se observa que la distribución de la β -hCG libre y la PAPP-A es significativamente diferente dependiendo de la corionicidad. Se obtuvieron dos efectos funcionales distintos dependiendo de la corionicidad en los dos parámetros (Tabla 7). Estas diferencias se relacionan con la edad gestacional. Tal como vemos representado en las figuras 2 y 3, los marcadores

séricos son significativamente más bajos en las gestaciones monocoriales que en las bicoriales.

Tabla 5. Características poblacionales del estudio I.

	Bicorial euploide (n=248)	Monocorial euploide (n=29)	<i>p</i>
Edad materna (años)	34.9	33.2	ns
Etnia (%)			ns
Caucásica	99.2	100	
No Caucásica	0.8	0	
Hábito tabáquico (%)			ns
No	87.6	86.2	
Sí	12.4	13.4	
Media CRL (mm)	64.19	59.03	0.021
Mediana TN (mm)	1.6	1.76	ns
Edad gestacional media en el momento de extracción (días±DT)	64.5640±7.36143	68.1379±7.57714	0.008

DT: desviación típica; CRL: longitud cráneo caudal; TN: translucencia nuca

Tabla 6. Medianas del los MoM corregidos de β -hCG libre y PAPP-A en gestaciones múltiples monocoriales y bicoriales euploides y únicos.

	Bicorial euploides (n=248)	Monocoriales euploides (n=29)	Gestaciones únicas (n=8592)	<i>P</i> (<i>monocorial/bicorial</i>)
Mediana cMoM β -hCG libre	1.74	1.41	1.00	0.035
Mediana cMoM PAPP-A	1.71	1.46	1.06	0.253

cMoM: MoM corregidos

Tabla 7. Modelo GAM.

	R-sq.(adj)	Devianza explicada	Modelo	Efecto funcional GLE
β-hCG libre	0.192	20.9%	Gemelos+s(días,por=Gemelos)+s(peso)	s(días, por=Bicorial):2.6, p<0.001 s(días, por=Monocorial):1, p<0.001
PAPP-A	0.557	56.2%	Gemelos+s(días,por=Gemelos)+s(peso)	s(días, por=Bicorial):1.27, p<0.001 s(días, por=Monocorial):1, p<0.001

S: Función suavizada; GLE: Grados de libertad explicados

Figura 1. Distribución de β -hCG libre y PAPP-A en gestaciones únicas en nuestra población

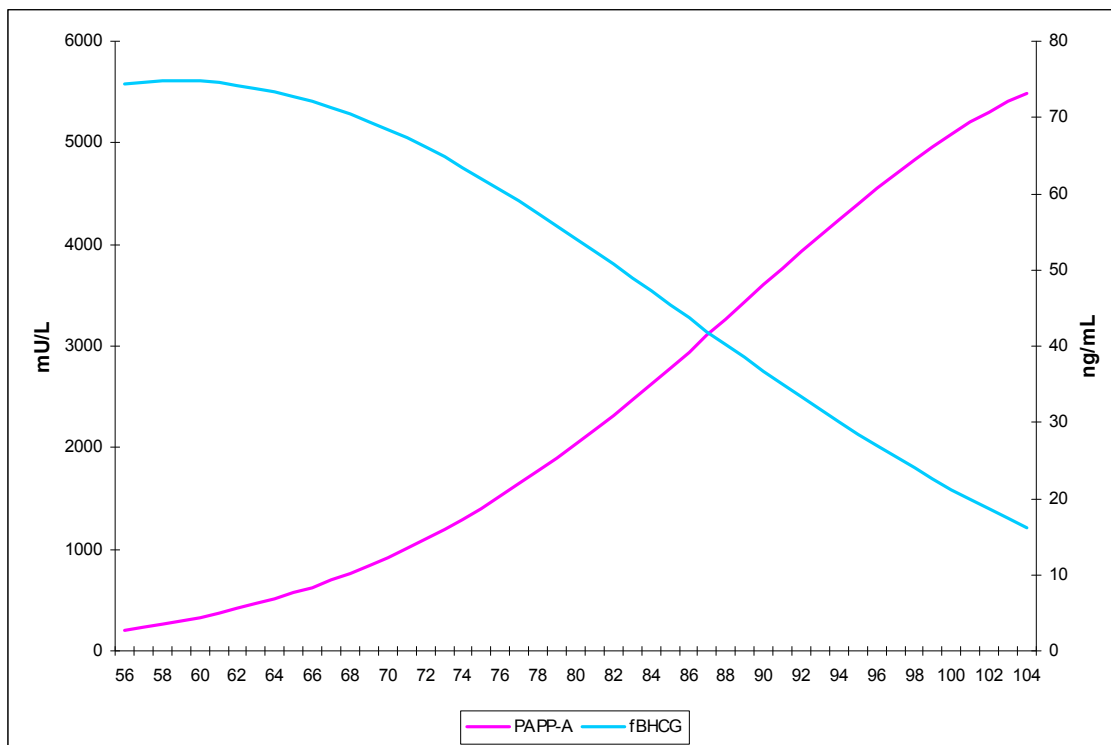


Figura 2. Concentración de β -hCG libre en el primer trimestre de gestación en gestaciones monocoriales y bicoriales.

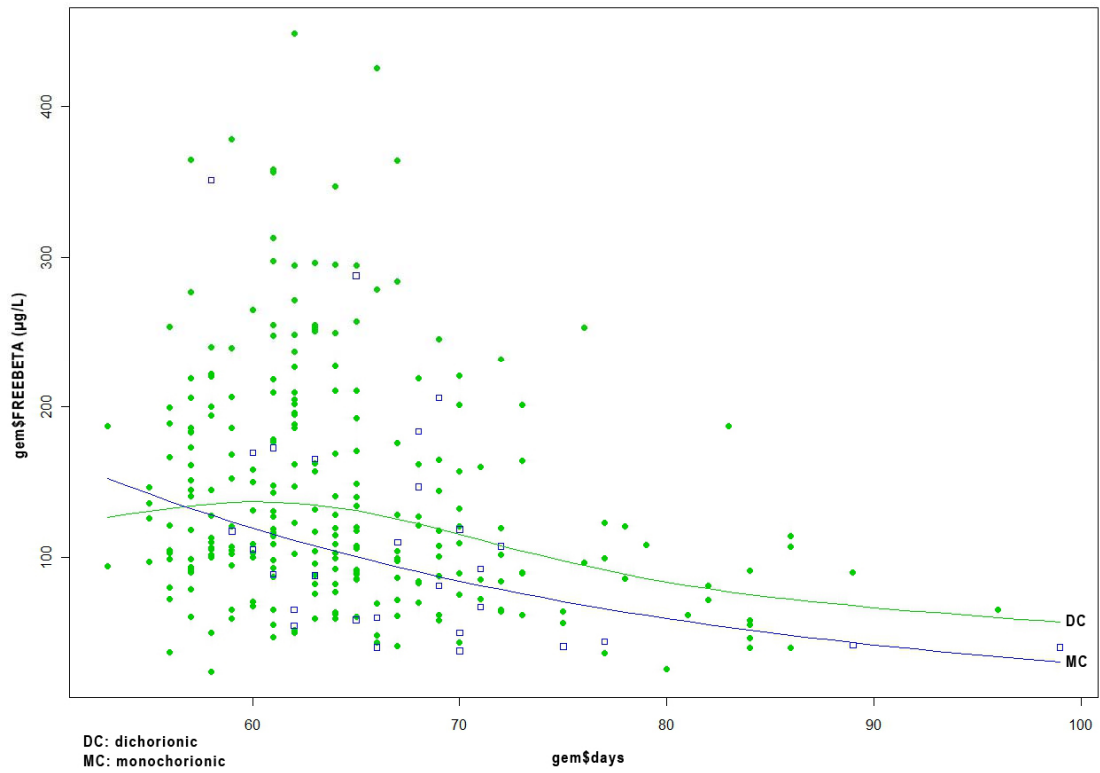
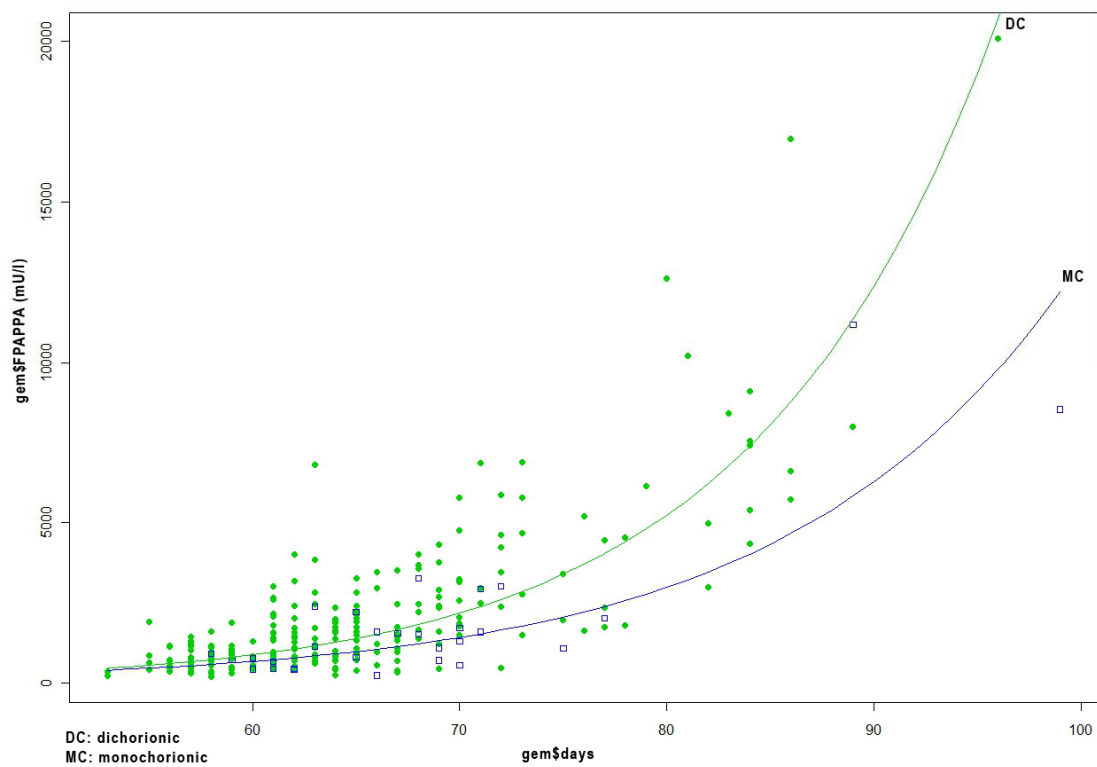


Figura 3. Concentración de PAPP-A en el primer trimestre de gestación en gestaciones monocoriales y bicoriales.



9.2 Estudio II

El estudio II analiza los valores de referencia de los marcadores hormonales y de la TN en gestaciones gemelares y únicos y estudia la influencia de la TRA en los marcadores de primer trimestre para determinar la efectividad del test combinado en las gestaciones gemelares y compararla con la de las gestaciones únicas en nuestra población.

En las gestaciones bicoriales la edad materna media fue de 35 años (rango 20-50) y en las monocoriales fue de 33 (rango 27-40). El 44% y el 20% de pacientes son mayores de 36 años en las gestaciones bicoriales y monocoriales, respectivamente. Las características poblacionales se muestran en la tabla 8. Sólo existen diferencias significativas en la edad materna y en las TRA, siendo las gestantes de gestaciones bicoriales las que presentan mayor proporción de TRA y las que tienen una edad materna mayor.

Entre los fetos gemelares que realizaron el test combinado un 5.8% (52/894) tuvieron un resultado de alto riesgo de síndrome de Down (punto de corte: 1/270): 48 de estos casos eran bicoriales y 4 monocoriales. De ellos, 39 fetos (75%) fueron en madres mayores de 36 años. Después del consejo genético, 12 mujeres rechazaron la práctica de una técnica invasiva. Del resto, 38 decidieron realizar una amniocentesis, y 2 una biopsia de corion. Hubo un caso de gestación bicorial de pérdida fetal pos amniocentesis debido a una corioamnionitis. En el resto de los casos, la gestación continuó sin problemas, al menos hasta los 28 días después del procedimiento invasivo. Se

identificaron 2 casos de síndrome de Down. Estos casos son los mismos que los del estudio I, donde ya se han sido descritos. El riesgo de síndrome de Down en el primer caso fue de 1/9 y en el segundo de 1/34. En el primer caso, la paciente declinó la práctica de una técnica invasiva, por lo que el diagnóstico se realizó al nacimiento. En el segundo caso, la paciente decidió realizar una reducción selectiva del feto afecto de síndrome de Down. El feto superviviente siguió una gestación normal, con parto a término.

En las gestaciones únicas, se identificaron 52 casos de síndrome de Down.

Si comparamos los valores de los marcadores bioquímicos y de la TN entre fetos no afectados únicos, bicoriales y monocoriales, observamos diferencias significativas en los valores de la β -hCG libre y la PAPP-A, pero no en la medida de la TN (Tabla 9).

No se encontraron diferencias significativas entre los valores de los marcadores séricos y la medida de la TN, entre las gestaciones espontáneas o producto de TRA, en los gemelos cromosómicamente normales (Tabla 10).

En la población a estudio en conjunto, el test combinado tuvo una TD del 98.1%, TFP del 5.9%, VPP del 7.7% y VPN del 99.9%. En la tabla 11 se muestran los resultados del test combinado en las gestaciones únicas, gemelares, bicoriales y monocoriales.

En las gestaciones múltiples, la TFP por feto del test combinado fue del 5.6% en los gemelos en general (95% IC 4.1-7.1), del 5.7% (95% IC 4.1–7.3) en los bicoriales, del 4.4% (95% IC 0.1–8.8%) en monocoriales y del 5.9% (95% IC 5.5–6.4) en gestaciones únicas. Si diferenciamos entre pacientes mayores o más jóvenes de 36 años, los resultados son peores en el grupo de mayor edad (Tabla 12).

El test combinado parece ser una estrategia efectiva, tanto en gestaciones múltiples bicoriales como en las únicas (Tabla 13). Debido a que no hay casos de síndrome de Down en el grupo monocorial no hemos podido realizar la curva ROC en este grupo.

Tabla 8. Características poblacionales del estudio II.

	Gemelos bicoriales (n=804)	Gemelos monocoriales (n=90)	Únicos (n=9868)	p
Media edad materna (años±DT)	35.4±4.5 ^{A,B}	34.2±3.2 ^A	33.5±4 ^B	0.001
Edad gestacional media en el momento de extracción (días±DT)	67.2±8.8	70.7±7.9	66.9±9	0.300
TRA (%)	30.3 ^{A,B}	2.2 ^A	4.8 ^B	0.001
Media peso materno (Kg±DT)	62.7±10.9	61±9.5	62.1 ±10.3	0.344
Hábito tabáquico (%)	10.9	13.3	10.7	0.289
Etnia(%)				
Caucásica	99.2	100	98.9	0.978
No Caucásica	0.8	0	1.1	
Media CRL (mm±DT)	63.9±8.7	61.9±7.9	63.4±8.41	0.063
Mediana NT MoM (mm)	0.97	0.98	0.97	0.460

TRA: técnicas de reproducción asistida, CRL: longitud cráneo caudal; TN: translucencia nucal; DT: desviación típica; MoM: múltiples de la mediana.

A= monocorial versus bicorial $p < 0.05$

B= bicorial versus únicos $p < 0.05$

Tabla 9. Valores de β -hCG libre, PAPP-A y NT en el primer trimestre de fetos euploides.

	Bicoriales	Monocoriales	Únicos	p^*	p^{**}	p^{***}
Mediana β -hCG libre MoM	1.74	1.44	0.97	0.01	0.001	0.001
Mediana PAPP-A MoM	1.72	1.51	0.96	0.03	0.001	0.001
Mediana TN MoM	0.97	0.98	0.97	0.460	0.593	0.639
Media \log_{10} del MoM β -hCG libre	0.26	0.20	-0.01	0.01	0.0005	0.0001
Media \log_{10} del MoM PAPP-A	0.24	0.17	-0.02	0.01	0.0005	0.0001
Media \log_{10} del MoM TN	-0.02	-0.02	-0.01	0.460	0.593	0.639
Desviación típica \log_{10} (MoM β -hCG libre)	0.23	0.29	0.25	0.389	0.895	0.766
Desviación típica \log_{10} (MoM PAPP-A)	0.24	0.24	0.25	0.88	0.997	0.995

TN: translucencia nucal; MoM: múltiples de la mediana; β -hCG: fracción beta libre de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo.

* gemelos bicoriales versus monocoriales

** gemelos monocoriales versus únicos

*** gemelos bicoriales versus únicos

Tabla 10. Mediana de los MoM de los marcadores (β -hCG libre, PAPP-A, TN) en gestaciones espontáneas o concebidas mediante TRA en las gestaciones gemelares cromosómicamente normales.

	Gestaciones espontáneas (n=649)	TRA (n=245)	<i>p</i>
Mediana β -hCG libre MoM	1.96	2.00	0.32
Mediana PAPP-A MoM	1.72	1.84	0.25
Mediana TN MoM	0.98	0.97	0.96

TN: translucencia nucal; MoM: múltiples de la mediana; B-hCG: fracción beta libre de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; TRA: técnicas de reproducción asistida.

Tabla 11. Resultados del test combinado en fetos gemelares, bicoriales, monocoriales y únicos.

	Riesgo de SD ≥ 270	N SD	TD	TFP	VPP	VPN
Gemelares global	52/894	2	100%	5.6%	3.8%	100%
Bicoriales	48/804	2	100%	5.7%	4.2%	100%
Monocoriales	4/90	0	-	4.4%	-	100%
Únicas	632/9868	52	94.1%	5.9%	8.1%	99.9%

SD: síndrome de Down; TD: tasa de detección; TFP: tasa de falsos positivos; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; N: número de casos.

Tabla 12: TFP por feto en gestaciones monocoriales, bicoriales y únicas, según edad materna.

TFP por feto (95% IC)	Gemelares global	Bicoriales	Monocoriales	Únicos
Global	5.6%[4.1%-7.1]	5.7% (4.1-7.3)	4.4%(0.1-8.8%)	5.9% (5.5-6.4)
<=35 años	2.5%[1.2%-3.8%]	2.2 %(0.9-3.6)	4.2%(0-8.9)	3.5% (3-3.9)
>36 años	9.9%[6.9%-13%]	10.2 %(7-13.3)	5.6% (0-17)	11.6% (10.5-12.8)

TFP: tasa de falsos positivos; IC: intervalo de confianza

Tabla 13. Curva ROC en gemelos bicoriales y únicos.

	AUC	95% IC
Gemelos bicoriales	0.998	0.995-1
Únicos	0.991	0.987-0.994

ROC: Receiver Operating Characteristic Curve; AUC: área bajo la curva; IC: intervalo de confianza.

10. Discusión

Las aneuploidías son causas mayores de muerte perinatal y de discapacidad en la infancia. Por ello, la detección de anomalías cromosómicas constituye la causa más frecuente de procedimientos invasivos. Los procedimientos invasivos, sin embargo, como conllevan un riesgo de pérdida fetal, sólo se deberían realizar en las gestaciones en riesgo de aneuploidía. En el caso que nos atañe, las gestaciones múltiples, el riesgo de pérdida fetal tras un procedimiento invasivo está aumentado por razones obvias. Aquí radica la importancia de que la efectividad del cribado de anomalías cromosómicas en el primer trimestre sea lo más alta posible en las gestaciones múltiples.

Como ya se comentó anteriormente en la introducción, a lo largo de la historia se han propuesto diferentes métodos de cribados de primer trimestre para las gestaciones únicas, y también para las múltiples. El primer método de cribado fue la EMA. La asociación síndrome de Down/EMA fue descrita por primera vez en 1909 por Shuttleworth (Shuttleworth, 1909). En las pacientes con gestaciones monocoriales, la designación de EMA es la misma que en las gestaciones únicas. Sin embargo, definir EMA es mucho más difícil en las gestaciones bicoriales (Meyers y col., 1997; Odibo y col., 2003; Rodis y col., 1990). Utilizar la EMA como cribado para el síndrome de Down representa grandes dificultades en este tipo de gestación. Además, la TFP es increíblemente alta. Desde el año 2004, el Grupo Internacional para el Screening de Síndrome de Down (Ferguson y col., 2004) no considera la EMA

como método de cribado para el síndrome de Down ni tampoco como indicación de técnica invasiva. Esto es especialmente relevante en las gestaciones múltiples, donde el grupo de pacientes con EMA es relativamente elevado: en la serie incluida en esta tesis, la edad media de las pacientes se encuentra alrededor de los 35 años (Tabla 8).

A partir de finales de la década de los 80, se fueron introduciendo diferentes métodos de cribado de aneuploidías. El rendimiento de los diferentes test de cribado en las gestaciones únicas ha aumentado a medida que se introducían diferentes marcadores (TN, β -hCG libre, PAPP-A, otros marcadores ecográficos). Como ya se ha comentado ampliamente en la introducción, en la actualidad se acepta el test combinado (edad materna +TN + β -hCG libre +PAPP-A) como el método de elección en las gestaciones únicas (Nicolaidis, 2011).

En el caso de las gestaciones múltiples, la prueba de cribado más ampliamente aceptada y sugerida en diferentes protocolos, como es el caso de la SEGO (Protocolos de la SEGO, 2004), es el cribado mediante TN en el primer trimestre. Este test, sin embargo, presenta una TFP elevada, por lo que el doctorando cree que otra prueba con mayor especificidad debería ser propuesta para el cribado de síndrome de Down en las gestaciones gemelares. La incorporación de los marcadores bioquímicos de primer trimestre (β -hCG libre, PAPP-A) al cribado mediante TN (test combinado) podría mejorar la efectividad de este test. Sin embargo, no podemos olvidar que añadir

marcadores bioquímicos maternos para el screening de síndrome de Down es difícil en las gestaciones múltiples porque no identifican el feto con riesgo.

Las concentraciones séricas de los marcadores bioquímicos en las gestaciones múltiples reflejan la presencia de dos fetos, y no uno: entre las semanas 11-13+6 los niveles séricos de estos marcadores en gemelos suelen ser el doble que en las gestaciones únicas. Se han propuesto diferentes fórmulas para incluir la bioquímica de primer trimestre al screening mediante TN en gemelares. Una de ellas es utilizar el “pseudo-riesgo”, propuesto por Wald (Wald y col., 1991). Este método de cálculo lo que hace es dividir los valores de los marcadores séricos (expresados en MoM) de gestaciones únicas normales de la misma edad gestacional, por los correspondientes MoM de gestaciones múltiples normales. De esta manera los resultados se interpretan como si se tratara de una gestación única usando distribuciones propias de gestaciones únicas. Basándose en valores obtenidos a las 11-13 semanas gestacionales, el efecto de la gestación en los valores de β -hCG libre y PAPP-A se ha asumido que es constante (Spencer y col., 2008; Linskens y col., 2009). En este sentido se pueden combinar los valores séricos y las medidas de la TN y así, calcular el “pseudo-riesgo”. Esta estrategia tiene como objetivo conseguir una TFP similar en únicos y múltiples. Mediante el uso del “pseudo-riesgo”, Spencer y Nicolaidis consiguieron una tasa de detección del 80% (Spencer y Nicolaidis, 2003). Otra alternativa, también propuesta por Wald (Wald y col., 2003) es calcular riesgos gestacionales: la concentración de los marcadores bioquímicos se relaciona con la *gestación* mientras que la medida de la TN es específica para cada *feto*. En las gestaciones múltiples, las medidas de la TN pueden

utilizarse separadas para obtener un riesgo feto específico o juntas para obtener un riesgo gestacional. Los marcadores séricos sólo nos proporcionan un riesgo gestacional. Si utilizamos los valores de la TN combinados y los marcadores bioquímicos obtendremos así un riesgo gestacional y no feto específico. El problema de este método es que existen pocos datos respecto a la distribución de los marcadores séricos en los casos de gestaciones múltiples concordantes o discordantes para trisomía 21. En un meta-análisis que incluyó publicaciones de todo el mundo publicado en 2005 (Spencer, 2005), solo consiguió reunir 6 casos de gestaciones múltiples concordantes para trisomía 21 y 23 gemelares discordantes para trisomía 21.

En los últimos años, sin embargo, se aboga por obtener la muestra sanguínea más precozmente, alrededor de las semanas 8-10 de gestación (Kirkegaard y col., 2008; Tørring y col., 2009). La extracción sanguínea precoz ha incrementado la demanda de curvas de normalidad de β -hCG libre y PAPP-A en gestaciones múltiples.

Para poder incorporar la bioquímica en el test combinado en dos tiempos en la gestación múltiple (extracción sanguínea precoz 8-10 semanas y estudio ecográfico a las 11-13+6 semanas), es necesario conocer la distribución de los marcadores séricos y si la corionicidad de la gestación múltiple posee un impacto en la misma.

La incorporación de los marcadores bioquímicos maternos (β -hCG libre y PAPP-A) al cribado mediante TN en las gestaciones múltiples no es materia fácil. El estudio de marcadores bioquímicos no aporta información feto específica, por lo que el cálculo de riesgo de síndrome de Down necesita ciertos ajustes. Se han propuesto diferentes estrategias para solucionar estos problemas como el cálculo de “pseudo-riesgo” o proporcionar riesgos gestación-específicos. Sin embargo, estas estrategias no parecen ser lo suficientemente satisfactorias. En los últimos años se ha propuesto realizar la muestra sanguínea de forma precoz. Para poder incorporar estos marcadores al test de cribado es necesario conocer su distribución normal en las gestaciones múltiples y el impacto de la corionicidad.

El estudio I incluido en esta tesis doctoral determina los valores de referencia de PAPP-A y β -HCG libre en el primer trimestre de la gestación según la corionicidad de la gestación gemelar y analiza la evolución de estos valores según la edad gestacional. El objetivo es conocer su distribución en la población gemelar euploide y aclarar el efecto que puede tener la corionicidad en la distribución de estos marcadores bioquímicos.

En este estudio se han establecido los valores de β -hCG libre y PAPP-A específicos para la corionicidad y edad gestacional, desde la semana 8 hasta la 13+6 de gestación.

En la sección de medicina fetal en la que trabaja el doctorando, el test combinado se realiza en dos pasos: extracción sanguínea entre las 8-13+6

semanas y estudio ecográfico entre las 11 y 13+6 semanas. La razón por la que realizamos el test en dos pasos es que la bioquímica es más sensible antes de las 10 semanas de gestación, como ya he comentado anteriormente en el punto 1.3 de la introducción. La mayoría de nuestras muestras sanguíneas se obtuvieron antes de las 10 semanas (figuras 2 y 3), pero realizamos extracciones hasta la 13+6 semanas ya que a veces, por motivos diversos, las pacientes no pueden realizar la muestra antes que la exploración ecográfica. En esos casos, se realizan los dos test el mismo día.

Los resultados demuestran que los valores de β -hCG libre y PAPP-A dependen de la edad gestacional, del nº de fetos y de la corionicidad. En las gestaciones bicoriales, tanto la β -hCG libre como la PAPP-A se incrementan aproximadamente 1.5 MoM respecto a los valores de las gestaciones únicas. Este incremento llega a ser de 2.0 MoM a las 13-14 semanas de gestación. En las gestaciones monocoriales, los niveles de ambos marcadores son muy similares a los de las gestaciones únicas a las 8-9 semanas de gestación, pero se incrementan a casi 2.0 MoM en el caso de la β -hCG libre y a 1.6 MoM en el caso de PAPP-A, hacia las 13-14 semanas gestacionales. La razón por la que el incremento de la PAPP-A en las gestaciones monocoriales es más bajo que en las únicas no se conoce con claridad, pero se cree que es debido a la existencia de una menor masa placentaria, respecto a las gestacionales bicoriales.

El estudio I también confirma que es necesario generar medianas específicas según la corionicidad de la gestación múltiple para poder utilizar estos

marcadores dentro de un test de cribado de aneuploidías de primer trimestre. En las gestaciones múltiples, los niveles de β -hCG libre y PAPP-A varían según la placentación, y estos valores son menores en las gestaciones monocoriales que en las bicoriales. En este estudio, las medianas de los MoMs de β -hCG libre y PAPP-A son mayores comparados con las medianas de las gestaciones únicas. En la serie incluida en esta tesis doctoral se demuestra, mediante un análisis de regresión suave, que los gemelos monocoriales tienen unos valores de β -hCG libre y PAPP-A MoM corregidos más bajos que los bicoriales. El doctorando escogió este modelo de análisis basándose en el hecho de que el mejor modelo es aquel que posee una mayor proporción de desviación explicada. La desviación explicada es la medida del grado de diferencia entre el valor observado y el predicho mediante el modelo de variable dependiente: cuanto mayor es la desviación, peor es el modelo. Idealmente, el mejor modelo tendría que tener la menor desviación posible en los modelos analizados.

El trabajo presentado en esta tesis demuestra que los niveles séricos de β -hCG libre y PAPP-A están íntimamente relacionados con la edad gestacional. Los niveles séricos cambian durante la gestación y son más bajos en las gestaciones monocoriales. Los niveles de PAPP-A aumentan a medida que avanza la gestación. Por el contrario, los niveles de β -hCG libre disminuyen a medida que la gestación progresa. Si analizamos estos resultados detenidamente, observamos que en los primeros días de la extracción sanguínea, los niveles de β -hCG libre en las gestaciones monocoriales son más altos que en los bicoriales. Suponemos que ello es debido a que al

principio de la semana 8 gestacional el número de muestras obtenido fue muy bajo y ello confunde los resultados. Desde el 58 día de la gestación, la concentración de β -hCG libre es mayor en las gestaciones bicoriales que en las monocoriales, como ya fue descrito previamente (Koster y col., 2010).

Los hallazgos del estudio I no son sorprendentes. Revisando la literatura vemos que ya habían sospechas de que el nivel sérico de β -hCG libre y PAPP-A está correlacionado con el número de masas placentarias (Spencer, 2000). En 1994, Johnson y colaboradores, (Johnson y col., 1994) demostraron que las concentraciones hormonales están relacionadas con el número de placentas. Si consideramos que los gemelos monocoriales comparten una sola placenta, los hallazgos presentados en esta tesis son respaldados con lo publicado en la literatura previamente (Johnson y col., 1994). Sin embargo, no todos los autores muestran unanimidad de criterio en cuanto al valor sérico de β -hCG libre y PAPP-A y su relación con la corionicidad (Tabla 14). Spencer (Spencer, 2001) publicó que no habían diferencias estadísticas entre la distribución de los marcadores séricos entre gestaciones monocoriales y bicoriales. Goncé y colaboradores (Goncé y col., 2005) demostró que sí que habían diferencias en los niveles de free- β -hCG, ya que los niveles de esta hormona eran más bajos en las gestaciones monocoriales si la muestra se tomaba antes de las semana 12 de gestación. Spencer de nuevo, en el 2008 (Spencer, 2008) con una muestra más amplia publicó que sí que habían diferencias en los niveles de PAPP-A pero no en los de β -hCG libre. Más recientemente, Liskens y colaboradores (Liskens y col., 2009) concluyeron que sí que habían diferencias estadísticamente significativas en los niveles de β -hCG libre y PAPP-A

dependiendo de la corionicidad de la gestación múltiple. Sin embargo, Koster (Koster y col., 2010) justo un año después concluyó todo lo contrario, ya que estos autores no encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos marcadores séricos. No existe consenso sobre cual es el mejor momento para la extracción sanguínea y el estudio de los marcadores en estos artículos. Quizás esto sea la causa por la que los resultados sean dispares. En la serie incluida en esta tesis doctoral la mayoría de extracciones son precoces (8-10 semanas) y en la mayoría de los estudios publicados se realizaron más tarde. A pesar de ello (una muestra precoz se asocia con una menor masa placentaria), demostramos que existe una diferencia en los valores de los marcadores bioquímicos dependiendo de si son gestaciones monocoriales o bicoriales.

Finalmente, Madsen y colaboradores (Madsen y col., 2011) concluyen que las medianas de los dos marcadores bioquímicos en gemelares bicoriales y monocoriales cromosómicamente normales muestran una relación edad gestacional específica, que son significativamente más altas que las observadas en las gestaciones únicas y que es imprescindible realizar diferentes curvas de distribución de β -hCG libre y PAPP-A séricas según se trate una gestación monocorial o bicorial. Estos autores proponen un nuevo algoritmo para el cálculo de riesgo de síndrome de Down que incluye medianas de los valores de β -hCG libre y PAPP-A específicas según la corionicidad de la gestación múltiple. Con este algoritmo las TD y de TFP son similares a las de las gestaciones únicas.

El doctorando recomendaría que todos los centros establecieran sus propias curvas de normalidad de β -hCG libre y PAPP-A en gestaciones múltiples para poder aplicar los factores de corrección adecuados para el cribado de síndrome de Down en las gestaciones múltiples.

Aportación de la tesis:

Los valores de β -hCG libre y PAPP-A son específicos según la corionicidad y edad gestacional.

Los valores de séricos de la β -hCG libre y PAPP-A son más bajos en las gestaciones monocoriales que en las bicoriales.

Aplicación clínica:

Se propone un nuevo factor de corrección en las gestaciones gemelares para el cálculo de riesgo de síndrome de Down: la corionicidad.

Limitaciones del estudio:

El número de gestaciones monocoriales es bajo.

Una vez estudiada la distribución de los marcadores bioquímicos en las gestaciones múltiples y cómo incorporarlos al cálculo de riesgo de síndrome de Down, el doctorando querría discutir los resultados del segundo estudio incluido en esta tesis doctoral. El estudio II analiza los valores de referencia de los marcadores hormonales y de la TN en gestaciones gemelares y únicas y estudia la influencia de la TRA en los marcadores de primer trimestre para

determinar la efectividad del test combinado en las gestaciones gemelares y compararla con la de las gestaciones únicas en nuestra población.

Primero querría comentar las características poblacionales del estudio. El 45.5% de las gestaciones bicoriales y 20% de las monocoriales presentaban una edad materna mayor de 36 años. Además, 30% de las gestaciones fueron concebidas mediante TRA, lo que ensalza todavía más la preocupación materna por riesgo de pérdida fetal debido a procedimientos diagnósticos. Es una población muy homogénea ya que no existen diferencias significativas en las medianas de MoM de TN, media de CRL, etnia, hábito tabáquico y peso materno. Las únicas diferencias se encuentran en el grupo de gestaciones bicoriales con mayor proporción de gestaciones conseguidas mediante TRA y con la media de edad más elevada.

Otro dato importante es que el trabajo publicado por el doctorando es el único que proporciona los valores de MoM de los parámetros bioquímicos desglosados en monocoriales y bicoriales.

Respecto a la TN varios autores han descrito que las gestaciones monocoriales tienen mayor prevalencia de TN aumentada que las bicoriales o únicas (Cheng y col., 2010; Sperling y col., 2007; Sebire y col., 2000). Existen varias hipótesis sobre la etiopatogenia de la TN aumentada (Snijders y col., 1998; Nicolaidis, 2004), y puede ser que la acumulación de líquido en la nuca fetal no sea debida a un solo mecanismo. Las diferentes hipótesis incluyen disfunciones en la actividad cardiaca, congestión venosa en el cuello y cabeza, alteraciones en

el tejido extracelular, hiperplasia de vasos linfáticos, infecciones congénitas, anemia y hipoproteinemia. Es posible también, que en las gestaciones monocoriales, el aumento de TN en un feto pueda ser una manifestación de fallo cardíaco debido a la hipervolemia que sigue a la transfusión feto fetal (Sebire y col., 2001). La influencia de la corionicidad sobre la medida de la TN y la existencia de medidas de TN distintas entre los gemelos en una misma gestación ha sido sujeta a varios estudios (Sebire y col., 1996; Matias y col., 2000; Sperling y col., 2007). Se ha descrito que la TN es 1.5 veces mayor en monocoriales que en bicoriales. Además, cerca de un 15% de las gestaciones monocoriales se complican con un síndrome de transfusión feto fetal (STFF), y esta complicación puede manifestarse con alteraciones en los marcadores de primer trimestre (Sebire y col., 1996). También se ha descrito que la prevalencia de TN aumentada es mayor en las gestaciones monocoriales que en las únicas. Según datos propios del centro y no publicados, en la serie incluida en esta tesis doctoral, a pesar de que 8 casos de gestaciones monocoriales se complicaron con STFF (17.7%) no hay diferencias significativas en los valores de MoM de la TN entre monocoriales y bicoriales (Tablas 8 y 9). La TN se encontraba elevada en sólo 2 casos de TTF (4 mm y 4.2 mm). Sin embargo, una de las limitaciones de este estudio es el bajo número de gestaciones monocoriales incluidas. El pequeño tamaño de esta muestra (45 gestaciones monocoriales) puede justificar que no existen diferencias en el valor de la TN en gestaciones gemelares bicoriales y monocoriales y únicas. El doctorando tiene abierta una línea de investigación en gestaciones múltiples y su intención es conseguir muestras más amplias que incluyan mayor número de gestaciones monocoriales con el objetivo de

estudiar la influencia de las complicaciones propias de las gestaciones monocoriales en los marcadores séricos y TN.

En el estudio II resaltamos los siguientes hallazgos:

La población es muy homogénea, solo presenta pacientes de mayor edad y mayor frecuencia de TRA en el grupo de gestaciones bicoriales.

Este estudio es el único que proporciona los valores de MoM de los parámetros bioquímicos desglosados en monocoriales y bicoriales.

Las medianas de MoM de la TN no difieren entre gestaciones monocoriales, bicoriales y únicos.

Las TRA, como ya es sabido, son una de las razones por la que ha aumentado la tasa de gemelares. Las pacientes sometidas a TRA presentan una escasa inclinación para la práctica de técnicas invasivas, ya que no desean correr ningún riesgo adicional de pérdida fetal (Meschede y col., 1998; Schover y col., 1998; Geipel y col., 1999). En estas gestantes la posibilidad de realizar un test no invasivo, como es el test combinado, para individualizar el riesgo de síndrome de Down, es una alternativa ampliamente aceptada. Sin embargo, como ya conocemos, los marcadores bioquímicos (β -hCG libre y PAPP-A) se ven influenciados por diferentes factores maternos como la etnia, diabetes, peso, hábito tabáquico. Como parte del proceso de cribado el doctorando cree que sería interesante conocer si las TRA tienen algún impacto en los valores séricos de β -hCG libre y PAPP-A o en la medida de la TN. En nuestra población de gestaciones múltiples, un 30% de las gestaciones bicoriales y

sólo 2.2% de las monocoriales son producto de TRA. En números totales, 245 de los fetos de las gestaciones múltiples fueron concebidos mediante TRA y 649 son fetos de gestaciones espontáneas.

Se postulan diferentes teorías por las que las TRA podrían tener un impacto en los niveles séricos de β -hCG libre y PAPP-A (Orlandi y col., 2002; Geipel y col., 2011): la paridad puede ser una de las causas ya que la mayoría de las pacientes que se someten a TRA suelen ser primíparas; otra teoría es el nivel de progesterona, que se encuentra muy elevado en las pacientes procedentes de FIV. La estimulación ovárica que sufren estas pacientes, el origen femenino de la esterilidad o placentación tardía de estos embriones se postulan también como posibles causas.

En el estudio II el doctorando no halló diferencias significativas en los valores de β -hCG libre y PAPP-A ni en la medida de TN (Tabla 10) entre gestaciones múltiples espontáneas o concebidas mediante TRA. Con motivo de esta tesis doctoral, he querido profundizar en estos resultados y separar las gestaciones según su corionicidad (Tabla 15). Al diferenciar según corionicidad, aun sin existir diferencias significativas, se observa una tendencia a que los valores difieran según el tipo de concepción. En las gestaciones monocoriales los niveles de PAPP-A y β -hCG son significativamente más bajos en el grupo de TRA. También paradójicamente, se observa una mediana de MoM de TN mucho más baja (1.0 MoM en espontáneos versus 0.83 MoM en TRA, $p=0.071$). En el grupo bicorial, los marcadores (PAPP-A y β -hCG y TN) son mucho más parecidos independientemente del tipo de concepción, aunque con

una tendencia a ser más elevados en el grupo de TRA (Tabla 15). Al estudiar la muestra, vemos que el número de fetos incluidos en el grupo de gestaciones monocoriales es excesivamente bajo (2). Esta escasa muestra puede confundir los resultados. El equipo en el que el doctorando trabaja sí que encontró diferencias significativas en el grupo de gestaciones únicas (Rodríguez y col., 2011). Según este estudio previo, los niveles de β -hCG libre y PAPP-A son significativamente diferentes en las gestaciones espontáneas con respecto a las procedentes de TRA: los niveles de β -hCG libre son más altos en las gestaciones de TRA, y en cambio los niveles de PAPP-A, son más bajos (Tabla 16.) Estas diferencias en los marcadores bioquímicos en las gestaciones procedentes de TRA podrían suponer una mayor TFP. Al añadir el factor de corrección "TRA", vemos que la TFP no aumenta sino que disminuye (TFP del 3.6% con factor de corrección FIV) en nuestra población de gestaciones únicas (Rodríguez y col., 2011).

Si revisamos la literatura, los resultados son dispares, y respecto a las gestaciones múltiples escasos y realizados en muestras muy pequeñas (Geipel y col., 2011) . Según Orlandi (Orlandi y col., 2002) los niveles de PAPP-A son más bajos en las gestaciones únicas procedentes de TRA. Este autor no encuentra diferencias significativas en los valores de los marcadores bioquímicos en las gestaciones múltiples, pero sí en las medidas de TN. Liao (Liao y col., 2001), un año antes publicó que tanto los valores de free- β -hCG como de PAPP-A diferían según el tipo de concepción: los niveles de β -hCG libre aumentaban en caso de TRA y los de PAPP-A disminuían. Debido a esta disminución en los niveles de PAPP-A, ambos autores concluyen que el test

combinado en gestaciones procedentes de TRA posee una TFP más elevada. Nuestro estudio II, sin embargo, con una muestra más amplia de gemelares no confirma estos hallazgos. El doctorando tiene abierta una línea de investigación en gestaciones múltiples y su intención es conseguir muestras más amplias para acabar de dilucidar la influencia de la TRA en los valores séricos de β -hCG libre y PAPP-A en las gestaciones múltiples.

A diferencia de lo que ocurre en las gestaciones únicas, el método de concepción (espontánea o TRA) no parece tener ninguna influencia en los niveles de β -hCG libre y PAPP-A ni en la medida de TN en la serie presentada por el doctorando de gestaciones múltiples. Sin embargo, son necesarias series más amplias que incluyan mayor número de gestaciones monocoriales para poder concluir cual es el papel de las TRA en los niveles séricos de β -hCG libre y PAPP-A.

En este estudio de 447 gestaciones gemelares, el uso del test combinado para el screening de trisomía 21 permitió el diagnóstico de todos los casos de síndrome de Down con una TFP global del 5.6% (5.7% en gemelares bicoriales y del 4.4% en monocoriales) (dintel de corte $\geq 1/270$) (Tabla 11). La TFP en gestaciones únicas es del 5.9%. Si desglosamos la TFP según la edad materna, vemos que en el grupo de mayor edad, la TFP se incrementa considerablemente en las gestaciones bicoriales (10.2%) y en el grupo de gestaciones únicas (11.6%). Este dato nos deja entrever el peso de la edad materna en el cálculo del riesgo de síndrome de Down, y la necesidad de ajustar el resto de los parámetros para que el factor edad influya en la medida

correcta. Es curioso, que el grupo con mejores resultados es el de las gestaciones monocoriales con sólo un 5.6% de TFP en pacientes mayores de 36 años. Querría destacar los resultados obtenidos en las gestaciones monocoriales, con una TFP global del 4.4%. Los marcadores incluidos en el cálculo de riesgo de síndrome de Down (β -hCG libre, PAPP-A y TN) pueden verse influidos por las complicaciones propias de las gestaciones monocoriales (CIR selectivo, STFF). En el estudio II incluido, solo 1 caso complicado con STTF y otro caso complicado con CIR selectivo tienen un riesgo de síndrome de Down elevado ($<1/10$ en el primer caso y $1/26$ en el segundo). Si analizamos los marcadores incluidos en el cálculo de riesgo de estas dos gestaciones observamos que en la gestación monocorial complicada con STTF los marcadores bioquímicos eran normales, pero las TN de ambos fetos eran patológicas (4 y 4.2mm); en cambio, la gestación monocorial con CIR selectivo presentaba unos MoM de β -hCG libre de 3.6 y de 0.8 de PAPP-A. Otro hallazgo del estudio II interesante es que, a pesar de no ser estadísticamente significativo, este estudio es el primero que demuestra unas TFP más bajas en gestaciones gemelares que en únicas en una misma población a estudio. Los resultados que esta tesis doctoral presenta (TD y TFP) son comparables a los publicados previamente (Tabla 4). La disminución de la TFP es importante porque conlleva, al mismo tiempo, una disminución en la necesidad de procedimientos invasivos. No podemos olvidar que la práctica de técnicas invasivas es más difícil en gestaciones múltiples y que están asociadas a un mayor riesgo de pérdida fetal.

Las limitaciones de este estudio se relacionan con el escaso número de fetos afectados de síndrome de Down. Los IC alrededor de la TFP son muy amplios. Esto es debido a que el número de casos afectados de trisomía 21 es escaso (2). El escaso número de fetos afectados es la mayor limitación de este estudio. Aunque detectamos el 100% de los casos en las gestaciones múltiples y el 94.1% en los únicos, el doctorando cree que nuestra TD hubiera sido más baja en caso de haber tenido más fetos con síndrome de Down. Uno de los inconvenientes más grandes, que hace prever una menor TD en series con más fetos con síndrome de Down, es que los valores de los marcadores bioquímicos en gestaciones gemelares afectas de síndrome de Down (concordante o discordante para este síndrome) no están suficientemente estudiados. Como ya he comentado el estudio más amplio con fetos afectados de síndrome de Down incluída 6 casos de gestaciones gemelares concordantes para síndrome de Down y 23 gemelares discordantes (Spencer, 2005). Es muy difícil que un solo centro consiga tener una serie con un elevado número de gestaciones múltiples con uno o dos fetos afectados de síndrome de Down. Para poder estudiar la distribución de los parámetros bioquímicos en este caso creo necesario la creación de un estudio multicéntrico, en el que participen diferentes centros y de esta manera poder aumentar el número de gemelos con síndrome de Down.

Mediante el análisis estadístico (curva ROC), el estudio II demuestra que la efectividad del test combinado en las gestaciones múltiples es mejor que en únicos. Esta afirmación se sustenta en que los IC de la curva ROC no se solapan.

Con motivo de la tesis doctoral, el doctorando ha realizado una meta-análisis sobre la efectividad del test combinado en las gestaciones múltiples. En este meta-análisis se han incluido los trabajos de Goncé (Goncé y col., 2005; Goncé y col., 2008), Chasen (Chasen y col., 2007), Spencer (Spencer y col., 2003) y el estudio II incluido en esta tesis doctoral. Los criterios de inclusión de la meta-análisis fueron que en los artículos se encontraran los siguientes datos: periodo de estudio, número de la muestra, número de fetos con síndrome de Down, especificidad y sensibilidad del test combinado en gestaciones múltiples. El número de gestaciones múltiples incluidas es de 1463 y se diagnostican 27 fetos con síndrome de Down. Según este meta-análisis, la sensibilidad del test combinado en las gestaciones múltiples es del 95% (IC 95% 0.751-0.999) con una especificidad del 94.1% (IC 95% 0.931-0.949) (Tabla 17) (Figura 4).

A raíz de los artículos incluidos en esta tesis y dentro de la línea de investigación cribado de aneuploidías y gestaciones gemelares, he creído conveniente comparar los diferentes métodos de cribado (edad materna, edad materna + TN, test combinado) en nuestra población de gestaciones gemelares. A pesar que este cálculo no está incluido en los artículos I y II, creo que es de relevancia. He realizado este análisis para poder añadir otro dato, que confirme o descarte al test combinado como el test más efectivo en el cribado de aneuploidías de primer trimestre en las gestaciones múltiples. El estudio se ha realizado utilizando la población incluida en el estudio II (447 gestaciones gemelares y dos casos con síndrome de Down). Los resultados de este estudio se muestran en la tabla 18. La sensibilidad es la misma en los tres

casos, pero la TFP es mucho más baja en el test combinado: del 50.2% en el cribado en edad materna, 10.6% mediante el cribado edad materna+TN y del 5.6% en el test combinado. Mediante el estudio estadístico (curva ROC) comprobamos que la efectividad del test combinado es mejor que la del cribado mediante edad materna aislada o edad maternal + TN (Tabla 19).

Los resultados de esta tesis doctoral tienen una gran relevancia clínica. A partir de ellos, el doctorando propone un cambio en la estrategia de cribado de aneuploidías de primer trimestre al introducir al test combinado como cribado de elección para las gestaciones múltiples.

Aportación de la tesis doctoral:

El test combinado en gestaciones bicoriales tiene una TD equiparable a la de las gestaciones únicas.

El test combinado en gestaciones múltiples disminuye la TFP.

Por primera vez, una serie demuestra una TFP más baja en gestaciones múltiples que en únicos, aunque la diferencia no sea estadísticamente significativa.

La serie publicada es la única hasta la fecha que diferencia el resultado del cribado según si la gestación gemelar es monocorial o bicorial.

Aplicación clínica:

Introducción del test combinado como método de elección en el cribado de aneuploidías de primer trimestre para las gestaciones gemelares.

Limitaciones del estudio:

El escaso número de fetos con síndrome de Down incluidos en la serie gemelar.

Tendencias

Como punto especial de la discusión, querría discutir brevemente la introducción de los marcadores ecográficos secundarios en el test combinado y las gestaciones gemelares. Ésta es una línea de investigación futura y abierta por el doctorando.

En las gestaciones únicas, como ya comenté en la introducción, ya se han introducido diferentes marcadores (hueso nasal, onda *a* revertida en el ductus

venoso, regurgitación tricuspídea) para aumentar la efectividad del test (Kagan y col., 2009; Maiz y col., 2009; Kagan y col., 2009). Todos estos autores han publicado TD por encima del 90% con TFP entre 2.5-3%. En las gestaciones únicas es ya una realidad incorporar un marcador secundario (generalmente aquel con el cual el explorador tenga más experiencia) para mejorar aún más la efectividad del test.

En gestaciones múltiples, la introducción de estos marcadores está mucho menos estudiado (Sepúlveda y col., 2009; Maiz y col., 2009., Cleary-Goldman y col., 2008). Todas estas series destacan las dificultades técnicas que suponen introducir nuevos marcadores ecográficos al cribado de primer trimestre debido a las características propias de las gestaciones múltiples: posición fetal, movimientos fetales, etc.

En la sección de Medicina Fetal donde ejerzo mi actividad profesional, en el año 2011, se añadió el IPDV (índice de pulsatilidad del ductus venoso) para el cribado de síndrome de Down en las gestaciones gemelares. Nuestra experiencia en gestaciones únicas es que la incorporación del estudio de la onda de flujo del ductus venoso mejoraba el resultado de cribado de primer trimestre para aneuploidías (Antolín y col., 2001, Rodríguez y col., 2010). En el último congreso de la ISUOG (International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology), realizado en septiembre del 2012 en Copenhague el equipo en el que trabajo presentó un estudio donde se demuestra que la incorporación de la medición del ductus venoso en el test combinado en gestaciones únicas mejoraba la especificidad del test. A raíz de los resultados, el mismo estudio

propone la realización de un test contingente o integrado que incorpore el IPDV, para mejorar la efectividad del test.

Una vez estudiada la efectividad del test combinado en las gestaciones múltiples, el doctorando propone mejorar los resultados de este cribado en las gestaciones múltiples con la introducción de marcadores ecográficos secundarios (IPDV) en el test combinado. Siguiendo la línea de investigación de esta tesis doctoral, realicé un estudio preliminar en la población de gemelares incluida en el estudio II con la intención de comparar diferentes tipos de cribados de primer trimestre en gestaciones múltiples. Para ello utilicé el software para el cálculo del índice de riesgo SsdWin6. Se analizaron los siguientes cribados: cribado mediante NT + edad materna, cribado mediante test combinado y cribado mediante test combinado + IPDV. Los resultados de este trabajo preliminar demuestran que la medición del ductus en las gestaciones gemelares no es sencillo (en 340 fetos de 894 no se pudo medir la onda de flujo del ductus venoso). La TFP del test combinado fue del 6.2%. Esta TFP disminuye hasta el 6% si se añade el IPDV (Tabla 20). Si comparamos la efectividad de los diferentes métodos de cribado mediante la curva ROC, el test más efectivo es el test combinado sin ductus (Tabla 21). Éste es un estudio preliminar todavía pendiente de publicación. Su principal inconveniente es el número elevado de casos que se excluyen del análisis informático debido a que no disponíamos de todos los parámetros (mayoritariamente el índice de pulsatilidad del ductus venoso). Sin embargo, por el momento, concluiría que la inclusión del ductus venoso no mejora los resultados expuestos en esta tesis doctoral.

Finalmente el doctorando querría destacar los **aspectos más relevantes** de esta tesis doctoral:

1. Aporta una mayor casuística que la previamente publicada referida a la población caucásica propia de nuestro entorno.
2. Analiza el cribado de aneuploidías de primer trimestre en las gestaciones gemelares, tema poco estudiado y con muy pocas series publicadas.
3. Aporta la distribución de la β -hCG libre y PAPP-A en nuestra población de referencia. Ello permite realizar todos los cálculos mediante datos propios.
4. Mediante el análisis estadístico queda demostrado que los valores de β -hCG libre y PAPP-A son específicos según la corionicidad y edad gestacional.
5. Mediante representación gráfica queda reflejado que los valores de séricos β -hCG libre y PAPP-A son más bajos en las gestaciones monocoriales que en las bicoriales.
6. En referencia al test combinado, este estudio es el único que proporciona los valores de MoM de los parámetros bioquímicos separados en monocoriales y bicoriales.
7. Es la serie más amplia publicada en la que se ha realizado una extracción sanguínea precoz.
8. Por primera vez, una serie demuestra una TFP más baja en gestaciones múltiples que en únicos, aunque la diferencia no sea significativa estadísticamente.

9. Nuestros resultados muestran que las TRA no tienen ninguna influencia sobre los marcadores de aneuploidías. Sin embargo, la muestra no es lo suficientemente amplia, sobretodo en el grupo de gestaciones monocoriales, como para poder ser concluyentes al respecto.
11. La **aplicación clínica** de los resultados. Esta tesis doctoral propone un cambio en la estrategia de cribado en la gestación gemelar y ello representa un avance importante en la práctica clínica: el doctorando sugiere al test combinado como el método de elección universal en el cribado de primer trimestre de aneuploidías en las gestaciones múltiples.

Y por último, pero no menos importante, querría remarcar cuales son las **limitaciones de esta tesis doctoral:**

1. El escaso número de fetos con síndrome de Down incluidos en la serie gemelar.
2. El número de gestaciones monocoriales es bajo.
3. No se estudia la repercusión que pueden tener las complicaciones propias de las gestaciones monocoriales sobre el valor de los marcadores de aneuploidías (TN, β -hCG libre y PAPP-A) ni en gestaciones espontáneas ni en gestaciones resultado de TRA.

Tabla 14. Diferencias en los valores de las medianas de MoM de β -hCG libre y PAPP-A en gestaciones bicoriales y monocoriales. Revisión de la literatura.

		n	Fecha extracción	PAPP-A	β -hCG libre
Spencer, 2001	Monocorial	45	10-14 semanas	0.89	1.00
	Bicorial	135		1.01	1.01
	<i>P</i>			>0.05	>0.05
Gonce y col., 2005	Monocorial	11	8-12 semanas	2.17	1.67
	Bicorial	87		1.92	1.54
	<i>P</i>			0.07	0.80
Spencer, 2008	Monocorial	190	11-13+6 semanas	1.76	1.98
	Bicorial	1024		2.25	2.04
	<i>P</i>			<0.05	0.93
Linskens y col., 2009	Monocorial	37	9-13+6 semanas	1.59	1.53
	Bicorial	163		2.40	2.11
	<i>P</i>			<0.05	<0.05
Koster y col., 2010	Monocorial	116	8-14 semanas	2.03	1.87
	Bicorial	650		2.18	1.89
	<i>P</i>			0.133	0.746
Madsen y col., 2011 (valores a las 13 semanas)	Monocorial	804	7-14 semanas	1.6	2.0
	Bicorial	4393		2.1	2.1
	<i>P</i>			-	-
Estudio I	Monocorial	27	8-13+6 semanas	1.50	1.41
	Bicorial	250		1.83	1.75
	<i>P</i>			0.039	<0.05

Tabla 15. Mediana de los MoM de los marcadores (β -hCG libre, PAPP-A, TN) en gestaciones espontáneas o concebidas mediante TRA en las gestaciones gemelares cromosómicamente normales.

	Corionicidad	Gestaciones espontáneas (n total=648)	TRA (n=246)	<i>p</i>
Mediana B-hCG libre MoM	Bicoriales	1.58 (n=560)	1.61 (n=244)	0.656
	Monocoriales	1.43 (n=88)	1.02 (n=2)	0.310
Mediana PAPP-A MoM	Bicoriales	1.47(n=560)	1.57(n=244)	0.392
	Monocoriales	1.51(n=88)	0.72 (n=2)	0.143
Mediana TN MoM	Bicoriales	0.94(n=560)	0.96 (n=244)	0.598
	Monocoriales	1.00(n=88)	0.83 (n=2)	0.071

TN: translucencia nuca; MoM: múltiples de la mediana; B-hCG: fracción beta libre de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo; TRA: técnicas de reproducción asistida.

Tabla 16. Marcadores bioquímicos y TN en gestaciones únicas espontáneas y producto de TRA.

	TRA (n=638)	Gestaciones espontáneas (n=9756)
Edad maternal media (años±DT)	35.02±3.6	33.2±3.7
>35 años	50.9%	31.3%
Free-B-hCG MoM (mediana y rango)	0.95*(0.17-5.26)	0.92(0.01-7.38)
PAPP-A MoM (mediana y rango)	0.83*(0.03-5.13)	1.05(0.04-11.37)
TN MoM (mediana y rango)	0.97(0.31-4.74)	0.97(0.25-6.02)

* $p < 0.05$

TRA: técnicas de reproducción asistida; DT: desviación típica; TN: translucencia nucal; free- B-hCG: fracción beta libre de la gonadotropina coriónica humana; PAPP-A: proteína plasmática A asociada al embarazo;; MoM: múltiples de la mediana; N: número de casos.

Tabla 17. Meta-análisis de los estudios sobre test combinado en gestaciones gemelares.

	Sensibilidad(95% IC)	Especificidad (95% IC)
Spencer y col. 2003	0.750 (0.194-0.994)	0.932 (0,903 -0,954)
Goncé y col. 2005	1.0 (0,292 – 1.000)	0.964 (0,928-0,986)
Chasen y col. 2007	1.0 (0,590-1.000)	0.930 (0,913-0,945)
Goncé y col. 2008	1.0 (0,398-1.0009)	0.965 (0,938-0,982)
Prats y col. 2012	1.0 (0,158-1.000)	0.943 (0,924-0,958)
	Pooled Sensibilidad 0.950 (0.751-0.999)	Pooled Especificidad 0.941 (0.931-0.949)

Figura 4. Meta-análisis y curva ROC de los estudios sobre test combinado en gestaciones gemelares.

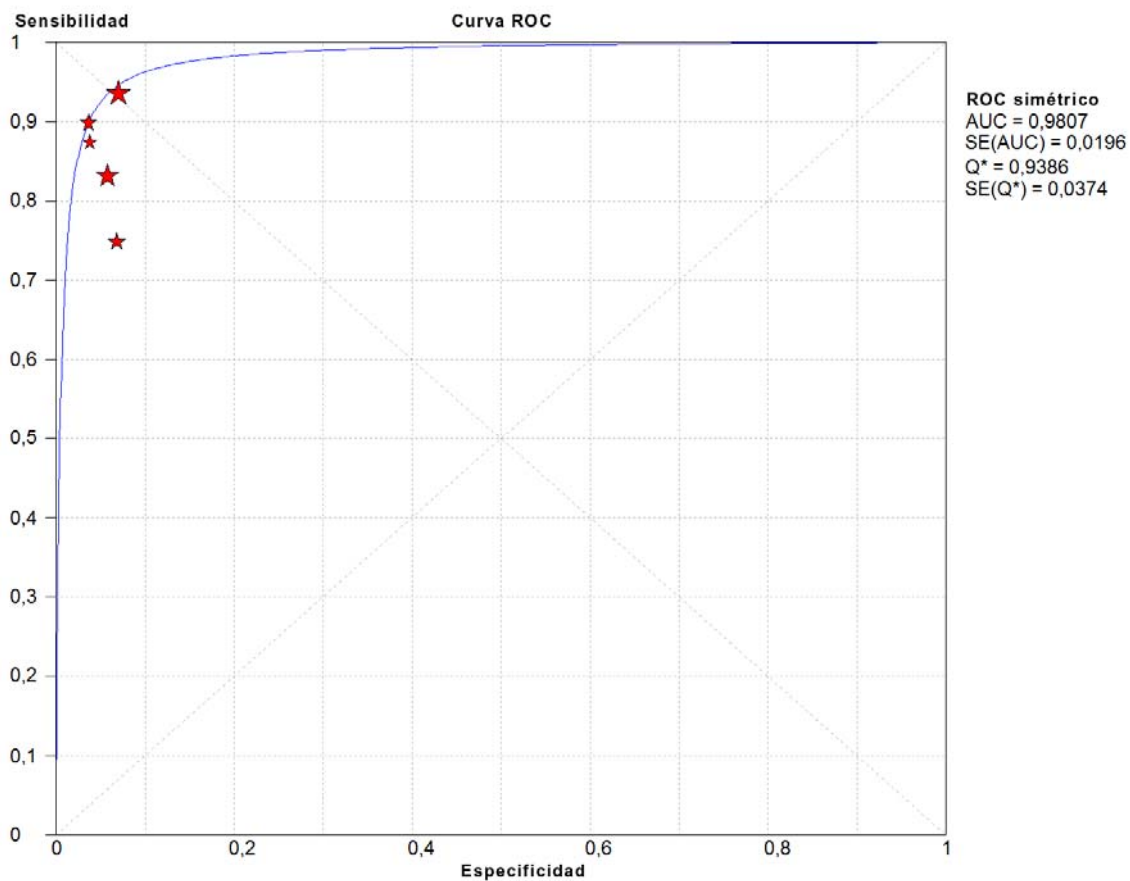


Tabla 18. Resultados del cribado mediante EM, EM +NT, test combinado en gestaciones gemelares.

	>=1/270	TD %	TFP %	VPP %	VPN %
EM					
Global	449/894	100	50.2	0.4	100
Bicoriales	414/804	100	50.6	0.5	100
Monocoriales	35/90	-	48.4	-	100
EM +TN					
Global	90/894	100	10.6	2	100
Bicoriales	82/804	100	10.4	2.3	100
Monocoriales	8/90	-	11.8	-	100
Test combinado					
Global	52/894	100	5.6	3.8	100
Bicoriales	48/804	100	5.7	4.2	100
Monocoriales	4/90	-	4.4	-	100

EM: edad maternal; TN; translucencia nucal; TD: tasa de detección; TFP: tasa de falsos positivos; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza

Tabla 19. Curva ROC en el cribado mediante edad materna, edad materna +TN y test combinado en gestaciones gemelares.

	AUC	IC (95%)
EM	0.833	0.802-863
EM+TN	0.992	0.987-998
Test combinado (bicoriales)	0.998	0.995-1

ROC: Receiver Operating Characteristic Curve; AUC: área debajo de la curva; IC: intervalo de confianza; IPDV: índice de pulsatilidad del ductus venoso; NT: nuchal translucency; EM: edad materna.

Tabla 20. Resultados del cribado mediante EM + TN, test combinado y test combinado + IPDV.

	$\geq 1/270$	TD %	TFP %	VPP %	VPN %
EM + TN					
Global	62/554	100	10.9	3.2	100
Bicoriales	56/502	100	10.8	3.6	100
Monocoriales	6/52	-	11.5	-	100
Test combinado					
Global	36/554	100	6.2	5.6	100
Bicoriales	34/502	100	6.4	5.9	100
Monocoriales	2/52	-	3.8	-	100
Test combinado + DVPI					
Global	35/554	100	6	5.7	100
Bicoriales	33/502	100	6.2	6.1	100
Monocoriales	2/52	-	3.8	-	100

EM: edad maternal; TN; translucencia nucal; IPDV: índice de pulsatilidad del ductus venoso; TD: tasa de detección; TFP: tasa de falsos positivos; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza

Tabla 21. Curva ROC en el cribado mediante edad maternal+TN, test combinado, test y test combinado+IPDV.

	AUC	IC (95%)
EM+TN	0.987	0.972-0.994
Test combinado	0.987	0.978-0.997
Test combinado+IPDV	0.983	0.977-0.996

ROC: Receiver Operating Characteristic Curve; AUC: área debajo de la curva; IC: intervalo de confianza; IPDV: índice de pulsatilidad del ductus venoso; NT: nuchal translucency; EM: edad maternal.

11. Conclusiones

En las gestaciones gemelares:

1. Los niveles séricos de β -hCG libre y PAPP-A entre las 8 y 13+6 semanas:

- a) Varían con la edad gestacional. En los resultados se incluyen las curvas de referencia de estos valores en nuestra población y en este periodo gestacional.
- b) Son más bajos en las gestaciones monocoriales que en las bicoriales.
- c) Existen diferencias significativas entre los valores de la β -hCG libre y PAPP-A en las gestaciones múltiples y las gestaciones únicas. Los niveles de ambos marcadores son más elevados en las gestaciones múltiples.

2. En la medida de la translucencia nucal:

- a) No existen diferencias en las medidas de TN en las gestaciones bicoriales y monocoriales.
- b) No existen diferencias en las medidas de TN en las gestaciones múltiples y únicas.

3. En cuanto a las estrategias de cribado:

- a) El test combinado precoz de aneuploidías es efectivo, con una sensibilidad y efectividad elevadas.
- b) No encontramos diferencias significativas en los niveles séricos de β -hCG libre y PAPP-A ni en la medida de la TN en las pacientes

procedentes de TRA en nuestra población. Sin embargo, existe una tendencia a que los valores de β -hCG libre y PAPP-A sean más altos en las pacientes sometidas a TRA.

- c) El test combinado precoz tiene una sensibilidad y efectividad equiparable a las obtenidas en las gestaciones únicas.
- d) El test combinado temprano es el más efectivo de las estrategias actuales. Los resultados de esta tesis demuestran que el test combinado precoz de aneuploidías puede ser implementado como cribado de elección.

12. Bibliografía

Agarwal K, Alfirevic Z. Pregnancy loss after chorionic villus sampling and genetic amniocentesis in twin pregnancies: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;28. doi: 10.1002/uog.10152.

American College of Obstetricians and Gynecologists. Multiple gestation: complicated twin, triplet, and high-order multifetal pregnancy. ACOG Practice Bulletin No. 56. Washington DC, American College of Obstetricians and Gynecologists, October 2004.

Ananth CV, Joseph KS, Demissie K, et al: Trends in twin preterm birth subtypes in the United States, 1989 through 2000: Impact on perinatal mortality. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:1076-1082.

Antolín E, Comas C, Torrents M, Muñoz A, Figueras F, Echevarría M, Cararach M, Carrera JM. The role of ductus venosus blood flow assessment in screening for chromosomal abnormalities at 10 –16 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; 17: 295–300

Audibert F, Gagnon A. Prenatal Screening for and Diagnosis of Aneuploidy in Twin Pregnancies. *J Obstet Gynaecol Can* 2011;33(7):754–767.

Belics Z, Fekete T, Beke A, Szabó I. Prenatal ultrasonographic measurement of the fetal iliac angle during the first and second trimester of pregnancy. *Prenat Diagn.* 2011 Apr;31(4):351-5

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: 219–225.

Blondel B, Kogan MD, Alexander GR, et al: The impact of the increasing number of multiple births on the rates of preterm birth and low birth- weight: An international study. *Am J Public Health* 2002;92:1323-1330.

Borenstein M, Persico N, Kagan KO, Gazzoni A, Nicolaides KH. Frontomaxillary facial angle in screening for trisomy 21 at 11 + 0 to 13 + 6 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008 Jul;32(1):5-11.

Borrell A, Casals E, Fortuny A, Farré MT, Goncé A, Sánchez A, et al. First-trimester screening for trisomy 21 combining biochemistry and ultrasound at individually optimal gestational ages. An interventional study. *Prenat Diagn* 2004;24:541–5.

Brizot ML, Snijders RJM, Bersinger NA, Kuhn P, Nicolaides KH. Maternal serum pregnancy associated placental protein A and fetal nuchal translucency thickness for the prediction of fetal trisomies in early pregnancy. *Obstet Gynecol* 1994;84: 918–922.

Brizot ML, Snijders RJM, Butler J, Bersinger NA, Nicolaides KH. Maternal serum hCG and fetal nuchal translucency thickness for the prediction of fetal

trisomies in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1995;102: 1227–1232.

Brandenburg H, van der Meulen JH, Jahoda MG, Wladimiroff JW, Niermeijer M, Habbema JD. A quantitative estimation of the effect of prenatal diagnosis in dizygotic twin pregnancies in women of advanced maternal age. *Prenat Diagn* 1994;14:243–56.

Carroll SGM, Soothill PW, Sherif AA, Porter H, Montague I, Kyle PM. Prediction of chorionicity in twin pregnancies at 10–14 weeks of gestation. *Br J Obstet Gynaecol* 2002;109: 182–186.

CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics. Spline Models for Observational Data. 1990; Grace Wahba: London. 0898712440 (ISBN 13: 9780898712445).

Chauhan SP, Scardo JA, Hayes E, et al: Twins: Prevalence, problems, and preterm births. *Am J Obstet Gynecol* 2010;203:305-315.

Chasen ST, Perni SC, Kalish RB, Chevernak FA. First trimester risk assessment for trisomies 21 and 18 in twin pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197:374.e1–3.

Cheng PJ, Huang SY, Shaw SW, Hsiaou CH, Kao CC, Chueh HY, Hsieh TT. Difference in nuchal translucency between monozygotic and dizygotic spontaneously conceived twins. *Prenat Diagn* 2010;30:247–50.

Cicero S, Curcio P, Papageorghiou A, Sonek J, Nicolaides KH. Absence of nasal bone in fetuses with Trisomy 21 at 11–14 weeks of gestation: an observational study. *Lancet* 2001;358: 1665–1667.

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 – 114.

Cleary-Goldman J, Berkowitz RL. First trimester screening for Down Syndrome in multiple pregnancies. *Semin Perinatol* 2005a;29:395-400.

Cleary-Goldman J, D'Alton ME, Berkowitz RL. Prenatal diagnosis and multiple pregnancy. *Semin Perinatol* 2005b;29:312–20.

Cleary-Goldman J, Malone FD, Vidaver J, et al: Impact of maternal age on obstetric outcome *Obstet Gynecol* 2005c;105:983-990.

Cleary-Goldman J, Rebarber A, Krantz D, *et al*. First-trimester screening with nasal bone in twins. *Am J Obstet Gynecol* 2008;3:283.e1-3.

Collins J: Global epidemiology of multiple birth. *Reprod Biomed On- line* 15(suppl 3):45-52, 2007.

Cuckle H, Benn P . Multianalyte maternal serum screening for chromosomal defects. In *Genetic Disorders and the Fetus: Diagnosis, Prevention and Treatment* (6th edn), Milunsky A (ed). 2009. Johns Hopkins University: Baltimore.

Cuckle H, Benn P, Wright D. Down syndrome screening in the first and/or second trimester: model predicted performance using meta-analysis parameters. *Semin Perinatol* 2005;29: 252–257.

Cuckle HS, van Lith JMM. Appropriate biochemical parameters in first- trimester screening for Down syndrome. *Prenat Diagn* 1999;19: 505–512.

Dallapiccola B, Stomeo C, Ferranti B, et al: Discordant sex in one of three monozygotic triplets. *J Med Genet* 1985;22:6-11.

Dias T, Arcangeli T, Bhide A, Napolitano R, Mahsud-Dornan S, Thilaganathan B. First-trimester ultrasound determination of chorionicity in twin pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011;38(5):530-2.

Dickey RP: The relative contribution of assisted reproductive technologies and ovulation induction to multiple births in the United States 5 years after the Society for Assisted Reproductive Technology/ American Society for

Reproductive Medicine recommendation to limit the number of embryos transferred. *Fertil Steril* 2007;88:1554- 1561.

Ekelund CK, Jørgensen FS, Petersen OB, Sundberg K, Tabor A; Danish Fetal Medicine Research Group. Impact of a new national screening policy for Down's syndrome in Denmark: population based cohort study. *BMJ* 2008;337: DOI:10.1136/bmj.a2547.

Eriksson AW, Fellman J: Temporal trends in the rates of multiple maternities in England and Wales. *Twin Res Hum Genet* 2007;10:626-632.

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.

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: 609–612.

Evans M, Ciorica D, Britt DW, Fletcher JC. Update on selective reduction. *Prenat Diagn* 2005;25:807–13.

Ferguson Smith M, Arbuzova S, Benn P, Canick J, Cuckle H, Fortuny A, et al. A position statement from the scientific committee of the International Down Syndrome Screening Group. *Down Syndrome Screening*, 2004.

Geipel A, Gembruch U, Berg C. Are first-trimester screening markers altered in assisted reproductive technologies pregnancies? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 2011, 23:183–189.

Geipel A, Gembruch U, Ludwig M, et al. Genetic sonography as the preferred option of prenatal diagnosis in patients with pregnancies following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999;14: 2629–2634.

Goncé A, Borrell A, Casals E, Steinvarcel F, Serés A, Cararach V, Gratacós E. Cribado de aneuploidía en gestación gemelar: resultados de la aplicación del test combinado. *Prog Obstet Gynecol* 2008;51(10):577–85.

Goncé A, Borrell A, Fortuny A, Casals E, Martínez MA, Mercade I, et al. First-trimester screening for trisomy 21 in twin pregnancy: does the addition of biochemistry make an improvement? *Prenat Diagn* 2005;25:1156–61.

González A: Embarazo múltiple. En: *Tratado de Obstetricia y Ginecología Vol.1*. J A Usandizaga y P de la Fuente. Mc-Graw Hill Interamericana. Madrid, 1997.

Hassan T, O'Coigligh S, Higgins S. Prenatal diagnosis of chorionicity in twins. *Ir Med J* 2001;104(8):243-245.

Hastie T, Tibshirani R. 1990. Generalized Additive Models. Chapman and Hall.

Hyett J, Moscoso G, Papapanagiotou G, Perdu M, Nicolaides KH. Abnormalities of the heart and great arteries in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency thickness at 11–13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynaecol* 1996;7: 245–250.

Huggon IC, DeFigueiredo DB, Allan LD. Tricuspid regurgitation in the diagnosis of chromosomal anomalies in the fetus at 11–14 weeks of gestation. *Heart* 2003;89: 1071–1073.

Imaizumi Y: Trends of twinning rates in ten countries, 1972-1996. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 1997;46:209-218.

Johnson MR, Abbas A, Nicolaides KH. Maternal plasma levels of human chorionic gonadotrophin, oestradiol and progesterone in multifetal pregnancies before and after fetal reduction. *J Endocrinol* 1994; 143(2): 309–12.

Kagan KO, Etchegaray A, Zhou Y, Wright D, Nicolaides KH. Prospective validation of first-trimester combined screening for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;34: 14–18.

Kagan KO, Wright D, Spencer K, Molina FS, Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomy 21 by free beta-human chorionic gonadotropin and

pregnancy-associated plasma protein-A: impact of maternal and pregnancy characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;31: 493–502.

Kagan KO, Valencia C, Livanos P, *et al.* Tricuspid regurgitation in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11+0 – 13+6 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;33:18 – 22.

Kagan KO, Cicero S, Staboulidou I, *et al.* Fetal nasal bone in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11–13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;33: 259–264.

Källén B, Finnström O, Lindam A, *et al.* Trends in delivery and neonatal outcome after in vitro fertilization in Sweden: Data for 25 years. *Hum Reprod* 2010;25:1026-1034.

Kirkegaard I, Petersen OB, Uldbjerg N, Tørring N. Improved performance of first-trimester combined screening for trisomy 21 with the double test taken before a gestational age of 10 weeks. *Prenat Diagn* 2008; 28: 839–844.

Kogan MD, Alexander GR, Kotelchuck M, *et al.* Trends in twin birth outcomes and prenatal care utilization in the United States, 1981-1997. *JAMA* 2000;284:335-341.

Koster MPH, Wortelboer EJ, Stoutenbeek P, Visser GHA, Schielen PCIJ. Distributions of current and new first-trimester Down syndrome screening markers in twin pregnancies. *Prenat Diagn* 2010; 30: 413–7.

Krantz DA, Hallahan TW, Orlandi F, et al. First-trimester Down syndrome screening using dried blood biochemistry and nuchal translucency. *Obstet Gynecol* 2000;96: 207–213.

Langdon Down J. 1866. Observations on an ethnic classification of idiots. *Lond Hosp Rep* 3: 259–262.

Lee YM, Cleary-Goldman J, Thaker HM, Simpson LL. Antenatal sonographic prediction of twin chorionicity *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 863–867.

Leung TY, Chan LW, Law LW, et al. First trimester combined screening for Trisomy 21 in Hong Kong: outcome of the first 10,000 cases. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009;22: 300–304.

Liao AW, Heath V, Kametas N, Spencer K, Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomy 21 in singleton pregnancies achieved by assisted reproduction. *Hum Reprod* 2001;16: 1501–1504.

Linskens IH, Spreeuwenberg MD, Blankenstein MA, van Vugt JMG. Early first-trimester free β -hCG and PAPP-A serum distributions in monochorionic and dichorionic twins. *Prenat Diagn* 2009; 29: 74–8.

Luke B, Brown MB, Grainger DA, et al: Practice patterns and outcomes with the use of single embryo transfer in the United States. *Fertil Steril* 2010;93:490-498.

Macfarlane A, Blondel B. 2005. Demographic trends in Western European countries. In: Blickstein I, Keith LG (eds). *Multiple Pregnancy: Epidemiology, Gestation, and Perinatal Outcome*. London: Taylor & Francis, 11–21.

Madsen HN, Ball D, Wright D, et al. A reassessment of biochemical marker distributions in trisomy 21-affected and unaffected twin pregnancies in the first trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011; 37: 38–47.

Maiz N, Kagan KO, Milovanovic Z, Celik E, Nicolaides KH: Learning curve for Doppler assessment of ductus venosus flow at 11 + 0 to 13 + 6 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;31:503–506.

Maiz N, Valencia C, Kagan KO, *et al.* Ductus venosus Doppler in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11 – 13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;33: 512 – 517.

Malone FD, Canick JA, Ball RH, et al. First- and Second-Trimester Evaluation of Risk (FASTER) Research Consortium. First-trimester or second- trimester screening, or both, for Down's syndrome. *N Engl J Med* 2005;353: 2001 – 2011.

Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD, et al: Births: Final data for 2007. Natl Vital Stat Rep 2010;58:1-85.

Martin JA, Hamilton BE, Ventura SJ, et al: Births: Final data for 2009. Natl Vital Statist Rep 60, 2011.

Matias A ,Gomes C ,Flack N ,Montenegro N ,Nicolaides KH. Screening for chromosomal abnormalities at 10 – 14 weeks: the role of ductus venosus blood flow. Ultrasound Obstet Gynecol 1998;12: 380–384.

Matias A, Montenegro N, Areias JC. Anticipating twin-twin transfusion síndrome in monochorionic twin pregnancy. Is there a role for nuchal translucency and ductus venosus blood flow evaluation at 11-14 weeks? Twin Res 2000;3:65-70.

Matias A, Montenegro N, Blickstein I: Down syndrome screening in multiple pregnancies. Obstet Gynecol Clin North Am 2005;32:81-86.

Maymon R, Jauniaux E, Holmes A, Wiener YM, Dreazen E, Herman A. Nuchal translucency measurement and pregnancy outcome after assisted conception versus spontaneously conceived twins. Hum Reprod 2001;16:1999–2004.

Menon DK. A retrospective study of the accuracy of sonographic chorionicity determination in twin pregnancies. Twin Res Hum Genet 2005; 8: 259–261.

Meschede D, Lemcke B, Stussel J, et al. Strong preference for non-invasive prenatal diagnosis in women pregnant through intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Prenat Diagn* 1998;18: 700–705.

Meyers C, Adam R, Dungan J, et al: Aneuploidy in twin gestations: when is maternal age advanced? *Obstet Gynecol* 1997;89:248-251,.

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: 867–869.

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

Nicolaides KH, Brizot ML, Snijders RJM. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for fetal trisomy in the first trimester of pregnancy. *Br J Obstet Gynecol* 1994;101:782-6.

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* 2005; 25: 221–6.

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

Odibo AO, Lawrence-Cleary K, Macones GA: Screening for aneuploidy in twins and higher-order multiples: is first-trimester nuchal translucency the solution? *Obstet Gynecol Surv* 2003;58:609-614.

Orlandi F, Rossi C, Allegra A, Krantz D, Hallahan T, Orlandi E, Macri J. First trimester screening with the free α -hCG, PAPP-A and nuchal translucency in pregnancies conceived with assisted reproduction. *Prenat Diagn* 2002;22:718–21.

Perlman EJ, Stetten G, Tuck-Muller CM, et al: Sexual discordance in monozygotic twins. *Am J Obstet Gynecol* 1990;37:551-557.

Prats P, Torrents M, Muñoz A, Echevarria M, Rodríguez MA. First trimester nuchal translucency screening for fetal aneuploidies in multiple pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;32:364 (OP16.02).

Protocolos de la SEGO. Embarazo Múltiple. 2004. www.sego.es.

Protocolos de la Generalitat de Catalunya. Departament de Salut. Protocol de diagnòstic prenatal d'anomalies congènites fetals. www.gencat.cat/salut

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. 2008; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org>.

Resta RG: Changing demographics of advanced maternal age (AMA) and the impact on the predicted incidence of Down syndrome in the United States: Implications for prenatal screening and genetic counseling. *Am J Med Genet A* 2005;133:31-36.

Rodis JF, Egan JF, Craffey A, et al: Calculated risk of chromosomal abnormalities in twin gestations. *Obstet Gynecol* 1990;76:1037-1041.

Rodriguez MA, Comas C, Echevarria M, Rodriguez I, Sabria J. Estrategias para mejorar el cribado de síndrome de Down: experiencia en el Instituto Dexeus (Barcelona). *Diagn Prenat* 2011;22(2):41–50.

Rogers JG, Voullaire L, Gold H: Monozygotic twins discordant for trisomy 21. *Am J Med Genet* 1982;11:143-146.

Schuchter K, Hafner E, Stangl G, et al. The first trimester 'combined test' for the detection of Down syndrome pregnancies in 4939 unselected pregnancies. *Prenat Diagn* 2002;22: 211–215.

Sebire NJ, Snijders RJ, Hughes K, Sepulveda W, Nicolaidis KH. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:999–1003.

Sebire NJ, Snijders RJM, Hughes K, Sepulveda W, Nicolaides KH. The hidden mortality of monochorionic twin pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1997;104: 1203–1207.

Sebire NJ, Souka A, Skentou H, Geerts L, Nicolaides KH. Early prediction of severe twin-to-twin transfusion syndrome. *Hum Reprod* 2000;15:2008–10.

Sebire NJ, Talbert D, Fisk NM. Twin-to-twin transfusión síndrome results from dynamic asymmetrical reduction in placental anastomoses: a hypothesis. *Placenta* 2001;22:383-391.

Sepulveda W, Sebire NJ, Hughes K, Odibo A, Nicolaides KH. The lamda sign at 10–14 weeks of gestation as a predictor of chorionicity in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1996;7: 421 – 423.

Sepulveda W, Sebire NJ, Hughes K, Kalegeropoulous A, Nicolaides KH. Evolution of the lambda or twin chorionic peak sign in dichorionic twin pregnancies. *Obstet Gynecol* 1997;89: 439–4341.

Sepulveda W, Wong AE, Casabuenas A. Nuchal translucency and nasal bone in first-trimester ultrasound screening for aneuploidy in multiple pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;33:152-6.

Schover LR, Thomas AJ, Falcone T, et al. Attitudes about genetic risk of couples undergoing in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998;13: 862–866.

Shetty A, Smith APM. The sonographic diagnosis of chorionicity. *Prenat Diagn* 2005;25:735-739.

Snijders RJ, Noble P, Sebire N, Souka A, Nicolaides K. UK multicentre Project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. Fetal Medicine Foundation First trimester screening group. *Lancet* 1998;352:343-346.

Souka AP, Snidjers RJM, NovakovA, Soares W, Nicolaides KH. Defects and syndromes in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998;11: 391–400.

Souka AP, Von Kaisenberg CS, Hyett JA, Sonek JD, Nicolaides KH. Increased nuchal translucency with normal karyotype. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192: 1005–1021.

Spencer K. Non-invasive screening test. 2005. In *Multiple pregnancy, epidemiology, gestation and perinatal outcome*. Blickstein I, Keith LG (eds). Taylor&Francis:Abingdon;368-384.

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. *Br J Obstet Gynaecol* 2003;110: 281–286.

Spencer K, Souter V, Tul N, Snijders R, Nicolaides KH. A screening program for trisomy 21 at 10–14weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free β -human chorionic gonadotropin and pregnancy associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999; 13: 231–7.

Spencer K. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester using free β -hCG and PAPP-A, combined with fetal nuchal translucency thickness. *Prenat Diagn* 2000; 20(2): 91–5.

Spencer K. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the firsttrimester: does chorionicity impact on maternal serum free β -hCG andPAPP-A levels? *Prenat Diagn* 2001; 21: 715–7.

Spencer K, Crossley JA, Aitken DA, et al. The effect of temporal variation in biochemical markers of trisomy 21 across the first and second trimesters of pregnancy on the estimation of individual patient specific risks and detection rates for Down's syndrome. *Ann Clin Biochem* 2003;40: 219–231.

Spencer K, Kagan KO, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester: and update of the impact of chorionicity on maternal serum markers. *Prenat Diagn* 2008; 28: 49–52.

Spencer K, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 in twins using first trimester ultrasound and maternal serum biochemistry in a one-stop clinic: a review of three years experience. *BJOG* 2003;110:276–80.

Sperling L, Kiil C, Larsen L, et al. Detection of chromosomal abnormalities, congenital abnormalities and transfusion syndrome in twins. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007;29:517–26.

Stone J, Ferrara L, Kamrath J, et al. Contemporary outcomes with the latest 1000 cases of multifetal pregnancy reduction (MPR). *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:406:e1-e4.

Summers AM, Langlois S, Wyatt P, Wilson RD; SOGC Genetics Committee; CCMG Committee on Prenatal Diagnosis; SOGC Diagnostic Imaging Committee. Prenatal screening for fetal aneuploidy. SOGC Clinical Practice Guideline No. 187, February 2007. *J Obstet Gynaecol Can* 2007;29:146–79.

Tørring N. Performance of first-trimester screening between gestational weeks 7 and 13. *Clin Chem* 2009; 55: 1564–1567.

Vandecruys H, Faiola S, Auer M, Sebire N, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 in monozygotic twins by measurement of fetal nuchal translucency thickness. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005;25:551–3.

Vink J, Fuchs K, D'Alton ME. Amniocentesis in twin pregnancies: a systematic review of the literature. *Prenat Diagn.* 2012 May;32(5):409-16.

Wald N, Cuckle H, Wu T, George L. Maternal serum unconjugated oestriol and human chorionic gonadotrophin levels in twin pregnancies: implications for screening for Down's syndrome. *BJ Obstet Gynecol* 1991;98:905-908.

Wald NJ, Rish S. Prenatal screening for Down syndrome and neural tube defects in twin pregnancies. *Prenat Diagn* 2005;25:740–5.

Wald NJ, Rodeck C, Hackshaw AK, et al. SURUSS Research Group. First and second trimester antenatal screening for Down's syndrome: the results of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURUSS). *Health Technol Assess* 2003;7: 1–88.

Wapner R, Thom E, Simpson JL, et al. First trimester maternal serum biochemistry and fetal nuchal translucency screening (BUN) study group. First trimester screening for trisomies 21 and 18. *N Engl J Med* 2003;349: 1405 – 1413.

Weisz B, Rodeck CH. Invasive diagnostic procedures in twin pregnancies. *Prenat Diagn* 2005; 25: 751–758.

Wood SL, St Onge R, Connors G, Elliot PD. Evaluation of the twin peak or lambda sign in determining chorionicity in multiple pregnancy. *Obstet Gynecol* 1996;88: 6–9.

Wright D, Spencer K, Kagan KO, et al. First-trimester combined screening for trisomy 21 at 7–14 weeks gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010;36: 404–411.

Zvanca M, Gielchinsky Y, Abdeljawad F, Bilardo K, Nicolaides KH. Hepatic artery Doppler in trisomy 21 and euploid fetuses at 11–13 weeks. *Prenat Diagn* 2011;31(1): 22–27.

13. Anexo

Artículo I

ORIGINAL ARTICLE

Early first-trimester free- β -hCG and PAPP-A serum distributions in mono chorionic and dichorionic twins

Pilar Prats*, Ignacio Rodríguez, Joan Nicolau and Carmina Comas

Fetal Medicine Service, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine, Institut Universitari Dexeus, Barcelona, Spain

*Correspondence to: Pilar Prats. E-mail: pilpra@dexeus.com

ABSTRACT

Objective To examine the distribution of first-trimester biochemical markers of aneuploidy in twins according to chorionicity.

Methods Maternal serum free- β -human chorionic gonadotropin (hCG) and pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) were measured between 8–13 + 6 weeks as a part of a routine first-trimester screening program in conjunction with fetal nuchal translucency measured at 11 to 13 + 6 weeks' gestation. Data from 279 twin pregnancies were extracted from our fetal databases. Down syndrome cases were excluded. Individual marker concentrations were expressed as weight, ethnicity, smoking and maternal diabetes corrected. To compare the distributions of the biochemical parameters, a generalized additive model was used adjusted to a smoothing regression model with the values transformed with base 10' logarithm using R software (generalized additive model-smoothing spline regression).

Results Free- β -hCG and PAPP-A distributions, analyzed with a generalized additive model adjusted to a smoothing regression model, were significantly different depending on the chorionicity. We graphically displayed the relationship between the predicted concentration of the free- β -hCG and PAPP-A and the gestational age in days for mono chorionic and dichorionic twins adjusted by weight.

Conclusion Pregnancy-associated plasma protein A and free- β -hCG values are gestational age specific. It is necessary to make a distinction between mono chorionic and dichorionic twins because biochemical markers are lower in mono chorionic than in dichorionic twins. © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Funding sources: None

Conflicts of interest: None declared

INTRODUCTION

The combined test (maternal age, fetal nuchal translucency (NT), measurement and maternal serum free- β -human chorionic gonadotrophin (hCG) and pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) concentrations) for chromosomal defects is now well established. It has shown to identify 90% of cases of trisomy 21 with 5% false positive rate in singleton pregnancies.^{1,2}

Screening for Down syndrome is also advisable in twin pregnancies. Both NT³ and maternal serum Biochemistry^{4,5} can be combined in twins providing detection rates approaching those achieved in singleton pregnancies.⁶ However, screening in twin pregnancies is complicated by several factors: risk estimation depends on the zygosity, which is not always definable; biochemical markers are not fetus-specific; the low number of Down syndrome cases in twin pregnancies cannot define a pathological distribution of the serum markers; and invasive testing implied more risk.

Previous studies have concentrated on setting reference values for free- β -hCG and PAPP-A in unaffected twins.^{4,5,7,8}

Lately, studies have been focused on possible differences in biochemical markers distribution between mono chorionic and dichorionic twins.^{10–12} Koster *et al.*¹¹ concluded there were no significant differences in biochemical parameters despite chorionicity. However, Spencer *et al.* found significant differences in PAPP-A values and Linskens *et al.*¹⁰ concluded that biochemical markers were significantly lower in mono chorionic twins.

In our centre, Down syndrome risk calculation in twin pregnancies was based on NT measurements until 2007. Since then, we applied the combined test to calculate Down syndrome risk. In this study, reference values for first trimester biochemical markers and possible differences between mono chorionic and dichorionic twins were investigated to provide more secure information on the distribution of free- β -hCG and PAPP-A in twin pregnancies.

METHODS

Our fetal medicine unit attended to 8592 singletons and 279 twin pregnancies from February 2007 to December 2010. All twin pregnancies were enrolled in this study. Twin pregnancies were offered the same screening test as singletons for trisomy 21: the combined test. This test analyzes ultrasound and biochemical data. An ultrasound was performed between 8 and 10 weeks' gestation. Chorionicity was classified as monochorionic if there was a single placenta mass in the absence of the lambda sign at the inter-twin membrane-placental junction, and dichorionic if there was a single placenta mass with lambda sign present or separate placentas. Serum samples were drawn between 8 and 13 + 6 weeks and serum analysis of free- β -hCG and PAPP-A levels was performed using a Krytor analyzer (BRAHMS[®], Berlin, Germany). An ultrasound examination was carried out at 11 to 13 + 6 weeks to measure crown rump length (CRL), NT and ductus venosus pulsatility index, and to diagnose any major fetal abnormalities. We excluded from the study 2 pregnancies diagnosed with trisomy 21 in one of the fetuses.

The data of 277 sets of twins were used for calculating the medians for the corrected multiple of the median (MoM) free- β -hCG and PAPP-A. The measured free- β -hCG and PAPP-A were converted to a multiple of the expected normal median (MoM) for a pregnancy of the same gestational day corrected for maternal weight,⁴ ethnicity¹³ smoking¹⁴ and maternal diabetes. Down syndrome combined test risk was performed using the commercial software SSDWLAB5. In the case of twin pregnancies, the correction factors applied for trisomy 21

risk calculation were weight, ethnicity, smoking and maternal diabetes.

Patients' characteristics of monochorionic and dichorionic twins are presented as mean \pm standard deviation and percentages (%) and tested for significance with independent *t*-test and χ^2 tests. Differences in weight-corrected MoMs of PAPP-A and free- β -hCG between monochorionic and dichorionic twins were assessed for significance with nonparametric Mann-Whitney *U*-test on the nontransformed MoMs and independent *t*-test of the logtransformed MoMs.

To compare the distributions of the biochemical markers, a generalized additive model (GAM) was used adjusted to a smoothing regression model with the values transformed with base 10'' logarithm using R software (generalized additive model-smoothing spline regression).¹⁵⁻¹⁷ GAMs are a generalization of the lineal and generalized lineal models. Its advantage being that they allow the dependent variable not to be distributed normally and the predictors are neither lineal, but rather parametrical functions. Therefore, with GAM we can adjust smooth regression models. The results of this analysis are graphically displayed.

RESULTS

A total of 279 twin pregnancies with known fetal outcome were enrolled. Chorionicity was known in all cases: 250 (89.6%) dichorionic and 29 (10.4%) monochorionic. Table 1 summarizes the characteristics of the group.

Table 1 Patients' characteristics

	Normal dichorionic (n = 248)	Normal monochorionic (n = 29)	p-value
Mean maternal age (years)	34.9	33.2	ns
Ethnicity (%)	—	—	—
Caucasian	99.2	100	
Non-Caucasian	0.8	0	ns
Smoking (%)			
No	87.6	86.2	—
Yes	12.4	13.4	ns
Mean CRL (mm)	64.19	59.03	0.021
Median NT (mm)	1.6	1.76	ns
Mean gestational age at maternal serum sampling (days \pm SD)	64.5640 \pm 7.36143	68.1379 \pm 7.57714	0.008

SD, standard deviation; CRL, crown rump length.

Table 2 First-trimester medians of corrected MoM free- β -hCG and PAPP-A for normal monochorionic and dichorionic twins and singleton pregnancies

	Normal dichorionic (n = 248)	Normal monochorionic (n = 29)	Singleton pregnancies (n = 8592)	p-value
Median cMoM free- β -hCG	1.74	1.41	1.00	0.035
Median cMoM PAPP-A	1.71	1.46	1.06	0.253

cMoM, corrected MoM.

Maternal serum sampling for free- β -hCG and PAPP-A was performed significantly earlier in dichorionic twins (64.5640 vs 68.1379, Mann–Whitney U -test, $p=0.008$)

Trisomy 21 was identified in 2 fetuses in 2 dichorionic pregnancies. In case 1, the affected fetus had NT 2.6 mm, CRL 51 mm, free- β -hCG concentration at 8 weeks was 126, 85 mU/L, corrected MoM 1.4 and PAPP-A was 301 ng/mL and 0.93 corrected MoM. In case 2, the affected fetus had NT 3.2 mm, CRL 72 mm, free- β -hCG concentration at 8 weeks was 120.89 mU/L, corrected MoM 1.52 and PAPP-A was 219.05 ng/mL and 0.79 corrected MoM.

Table 2 shows the medians for the corrected MoM free- β -hCG and PAPP-A for both monozygotic and dichorionic twins compared with singleton pregnancies in the same period

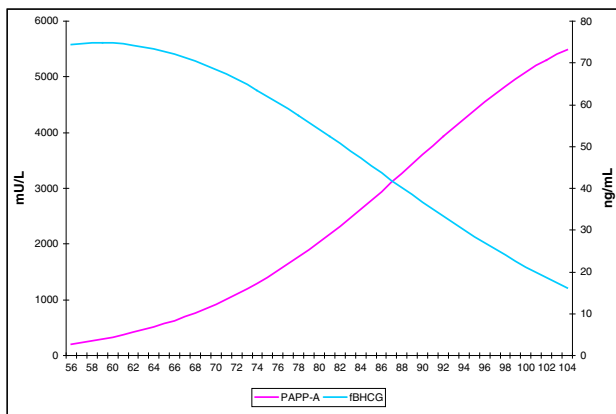


Figure 1 Local curve of free- β -hCG and PAPP-A distribution

to validate the results in multiple pregnancies. Figure 1 displays free- β -hCG and PAPP-A in our population.

The logtransformed corrected MoMs for free- β -hCG was 0.2644 and 0.1595 in dichorionic and monozygotic twins, respectively ($p=0.017$). PAPP-A value was 0.2398 in dichorionic twins and 0.1697 in monozygotic ($p=0.166$).

A generalized additive model was used to determine whether biochemical markers free- β -hCG and PAPP-A differ according to the type of placentation. Figures 2 and 3 graphically display the relationship between the predicted concentration of the free- β -hCG and PAPP-A and the gestational age in days for monozygotic and dichorionic twins adjusted by weight.

When we adjusted the GAM model, β -hCG and PAPP-A concentration distribution was significantly different depending on the chorionicity. We obtained two different functional effects regarding the chorionicity for both parameters (Table 3). These differences are gestational age related. As depicted in Figures 2 and 3, biochemical parameters are significantly lower in monozygotic than in dichorionic twins.

DISCUSSION

In this study, distributions of free- β -hCG and PAPP-A during first trimester of gestation were established to investigate whether twin chorionicity should be incorporated into prenatal screening for trisomy 21.

To study the serum levels of free- β -hCG and PAPP-A is justified because their interpretation in twins is controversial. Moreover, determination of the individual contribution of each fetus is not possible.

We established chorionicity-specific and gestational age-specific values for PAPP-A and free- β -hCG from 8 to 13 + 6 weeks.

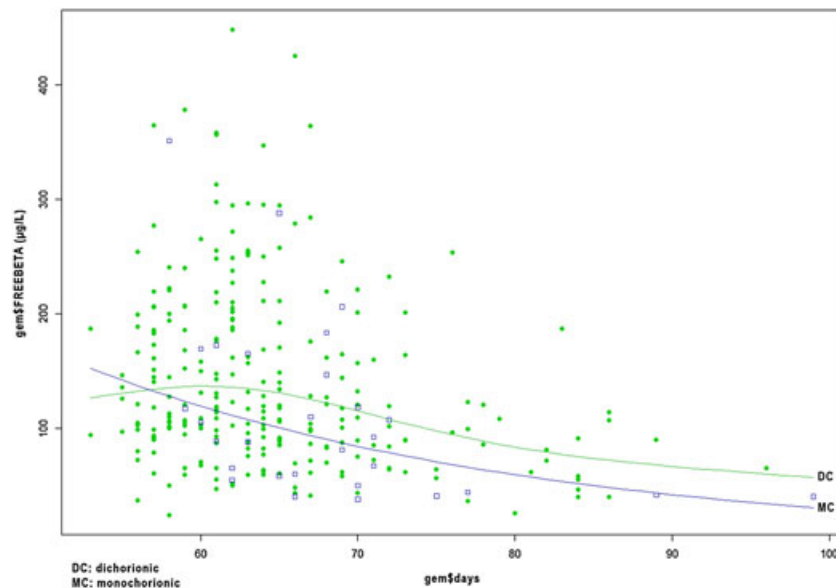


Figure 2 Free- β -hCG concentrations in the first trimester of pregnancy for monozygotic and dichorionic twins

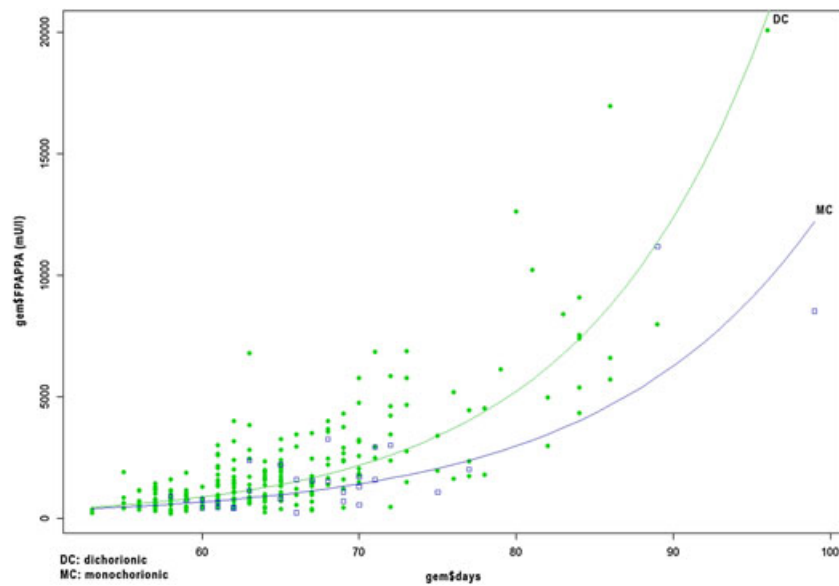


Figure 3 PAPP-A concentrations in the first trimester of pregnancy for monochorionic and dichorionic twins

Table 3 GAM model

	R-sq. (adj)	Deviance explained	Model	Functional effect and EDF
Free-β-hCG	0.192	20.9%	Twins + s(days, by = Twins) + s (weight)	s(days, by = Dichorionic):2.6, $p < 0.001$ s(days, by = Monochorionic):1, $p < 0.001$
PAPP-A	0.557	56.2%	Twins + s(days, by = Twins) + s (weight)	s(days, by = Dichorionic):1.27, $p < 0.001$ s(days, by = Monochorionic):1, $p < 0.001$

S, smoothing function; EDF, estimated degrees of freedom.

The results show that PAPP-A and free-β-hCG values are highly dependent upon the time of sampling in the first trimester and that is necessary to generate chorionicity-specific medians for twin pregnancies to use the biochemical markers in risk assessment of fetal aneuploidies in twin pregnancies.

In twins the levels of serum PAPP-A and free-β-hCG change with gestation and these levels are lower in monochorionic twins than in dichorionic twins.

In our study, the median MoMs of PAPP-A and free-β-hCG were higher compared with singleton pregnancies and comparable to medians found in previous studies (Table 4).^{8–12,18}

Our study, applying a smoothing regression analysis, demonstrates that monochorionic twins have a significantly lower corrected MoM for free-β-hCG and PAPP-A. We chose this model of analysis on the basis that the best model is the one with a major proportion of deviance explained. Deviance explained is a measurement of the degree of difference between the observed and the predicted value by the model of dependent variable: the greater the deviance, the worse the model. Ideally, the best model should have the least deviance of the analyzed models.

Finding different biochemical marker distributions in monochorionic and dichorionic twins is not surprising, because there have been suggestions that maternal serum levels are proportional to the number of fetoplacental units.⁴ In 1994, Johnson *et al.*¹⁹ demonstrated that hormone concentrations are correlated with the number of placental masses. Taking into account that monochorionic twins share a unique placental tissue, our findings are supported by what was previously described.¹⁹ Our results show, as graphically displayed, that the values for PAPP-A and free-β-hCG are highly dependent upon the time of sampling in the first trimester. Serum levels change with gestation and these levels are lower in monochorionic than in dichorionic twins. PAPP-A serum levels increase as the gestation progresses. On the contrary, free-β-hCG serum concentrations decrease. Analyzing our data we observe that in the very first days of sampling, monochorionic values of free-β-hCG are higher than in dichorionic twin pregnancies. We believe that this crossing of serum values could be due to the few samples drawn at the beginning of the eighth week of pregnancy. From the 58th day of gestation, free-β-hCG serum concentration

Table 4 Differences in median MoM values of PAPP-A and free- β -hCG in monochorionic and dichorionic twin pregnancies. Review of the literature

		<i>n</i>	Sample date	PAPP-A	free- β -hCG
Spencer, 2001 ¹⁸	Monochorionic	45	10–14 weeks	0.89	1.00
	Dichorionic	135		1.01	1.01
	<i>p</i> -value			>0.05	>0.05
Gonce <i>et al.</i> , 2005 ⁸	Monochorionic	11	8–12 weeks	2.17	1.67
	Dichorionic	87		1.92	1.54
	<i>p</i> -value			0.07	0.80
Spencer <i>et al.</i> , 2008 ⁹	Monochorionic	190	11–13 + 6 weeks	1.76	1.98
	Dichorionic	1024		2.25	2.04
	<i>p</i> -value			<0.05	0.93
Linskens <i>et al.</i> , 2009 ¹⁰	Monochorionic	37	9–13 + 6 weeks	1.59	1.53
	Dichorionic	163		2.40	2.11
	<i>p</i> -value			<0.05	<0.05
Koster <i>et al.</i> , 2010 ¹¹	Monochorionic	116	8–14 weeks	2.03	1.87
	Dichorionic	650		2.18	1.89
	<i>p</i> -value			0.133	0.746
Madsen <i>et al.</i> , 2011 ¹²	Monochorionic	804	7–14 weeks	1.6 (13wks)	2.0
	Dichorionic	4393		2.1	2.1
	(values at 13 wks) <i>p</i> -value				
Current study	Monochorionic	27	8–13 + 6 weeks	1.50	1.41
	Dichorionic	250		1.83	1.75
	<i>P</i> -value			0.039	<0.05

is higher in dichorionic than in monochorionic twins, as previously reported.¹¹

If we review literature, Spencer in 2001¹⁸ showed that there was no statistical difference between the markers' distribution between unaffected monochorionic and dichorionic twins. Gonce *et al.* (2005)⁸ demonstrated that weight-corrected MoM free- β -hCG are significantly reduced in monochorionic compared with dichorionic twins in samples taken before 12 weeks' gestation.⁸ Spencer, in 2008,⁹ with a wider study, concluded that there were statistical differences in PAPP-A levels, but not the values of free- β -hCG. More recently, Linskens *et al.*¹⁰ concluded that there were statistical differences in PAPP-A levels and in the values of free- β -hCG, as well. However, Koster *et al.*¹¹ just one year ago, could not find these differences. Finally, Madsen *et al.*¹² in this present year, demonstrated that medians for the two biochemical markers for monochorionic and dichorionic twins in unaffected pregnancies show a gestational age-specific increase relative to singleton medians highlighting the importance of generation chorionicity-specific medians for these markers in twins.

In conclusion, in twins, PAPP-A and free- β -hCG serum levels change with gestation and are lower in monochorionic twins than in dichorionic twins. We need to make a distinction

between monochorionic and dichorionic twins because biochemical markers are significantly lower in monochorionic than in dichorionic twins.

ACKNOWLEDGEMENT

Under the auspices of the Càtedra d' Investigació en Obstetrícia i Ginecologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

WHAT'S ALREADY KNOWN ABOUT THIS TOPIC?

- Generation of chorionicity-specific medians for the biochemical markers and their use in risk assessment could improve the performance of first-trimester screening for chromosomal abnormalities in twins.

WHAT DOES THIS STUDY ADD?

- In a series of 279 twins we showed that biochemical markers are lower in monochorionic than in dichorionic twins.

REFERENCES

1. Spencer K, Souter V, Tul N, Snijders R, Nicolaides KH. A screening program for trisomy 21 at 10–14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free β -human chorionic gonadotropin and pregnancy associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999; **13**: 231–7.
2. 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* 2005; **25**: 221–6.
3. Sebire NJ, Snijders RJM, Hughes K, Sepulveda W, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. *Br J Obstet Gynecol* 1996; **103**: 99–1003.
4. Spencer K. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester using free β -hCG and PAPP-A, combined with fetal nuchal translucency thickness. *Prenat Diagn* 2000; **20**(2): 91–5.
5. Spencer K, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 in twins using first trimester ultrasound and maternal serum biochemistry in one-stop clinic: a review of three year experience. *BJOG* 2003; **110**(3): 276–80.
6. Chasen ST, Perni SC, Kalish RB, Chevermak FA. First trimester risk assessment for trisomies 21 and 18 in twin pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2007; **197**: 374.e1–374.e3.
7. Niemimaa M, Suonpa M, Heinonen S, Seppala M, Bloigu R, Ryyanen M. Maternal serum human chorionic gonadotrophin and pregnancy-associated plasma protein A in twin pregnancies in the first trimester. *Prenat Diagn* 2002; **22**(3): 183–5.
8. Gonc A, Borrell A, Fortuny A. First trimester screening for trisomy 21 in twin pregnancy: does the addition of biochemistry make an improvement? *Prenat Diagn* 2005; **25**(12): 1156–61.
9. Spencer K, Kagan KO, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester: and update of the impact of chorionicity on maternal serum markers. *Prenat Diagn* 2008; **28**: 49–52.
10. Linskens IH, Spreeuwenberg MD, Blankenstein MA, van Vugt JMG. Early first-trimester free β -hCG and PAPP-A serum distributions in monozygotic and dizygotic twins. *Prenat Diagn* 2009; **29**: 74–8.
11. Koster MPH, Wortelboer EJ, Stoutenbeek P, Visser GHA, Schielen PCIJ. Distributions of current and new first-trimester Down syndrome screening markers in twin pregnancies. *Prenat Diagn* 2010; **30**: 413–7.
12. Madsen HN, Ball D, Wright D, *et al*. A reassessment of biochemical marker distributions in trisomy 21-affected and unaffected twin pregnancies in the first trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011; **37**: 38–47.
13. Spencer K, Heath V, El-Sheikha A, Ong CYT, Nicolaides KH. Ethnicity and the need of correction of biochemical and ultrasound markers of chromosomal anomalies in the first trimester: a study of Oriental, Asian and Afro-Caribbean populations. *Prenat Diagn* 2005; **25**: 365–9.
14. Spencer K, Bindra R, Cachao AM, Nicolaides KH. The impact of correcting for smoking status when screening for chromosomal anomalies using maternal serum biochemistry and fetal nuchal translucency thickness in first trimester of pregnancy. *Prenat Diagn* 2004; **24**: 169–73.
15. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. 2008; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org>
16. CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics. *Spline Models for Observational Data*. 1990; Grace Wahba: London. 0898712440 (ISBN 13: 9780898712445).
17. Hastie T, Tibshirani R. 1990. *Generalized Additive Models*. Chapman and Hall.
18. Spencer K. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester: does chorionicity impact on maternal serum free β -hCG and PAPP-A levels? *Prenat Diagn* 2001; **21**: 715–7.
19. Johnson MR, Abbas A, Nicolaides KH. Maternal plasma levels of human chorionic gonadotrophin, oestradiol and progesterone in multifetal pregnancies before and after fetal reduction. *J Endocrinol* 1994; **143**(2): 309–12.

Artículo II

ORIGINAL ARTICLE

First trimester risk assessment for trisomy 21 in twin pregnancies combining nuchal translucency and first trimester biochemical markers

Pilar Prats^{1*}, Ignacio Rodríguez¹, Carmina Comas¹ and Bienvenido Puerto²

¹Fetal Medicine Service, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine, Institut Universitari Dexeus, Barcelona, Spain

²Department of Maternal Fetal Medicine, Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

*Correspondence to: Pilar Prats. E-mail: pilpra@dexeus.com

ABSTRACT

Objective The aim is to describe the performance of first-trimester combined risk assessment in twin pregnancies.

Methods Maternal serum free beta-human chorionic gonadotrophin and pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) were determined at 8 to 12 weeks and fetal nuchal translucency (NT) was measured at 11 to 13+6 weeks. The individual risk was estimated for each fetus using the combined test in dichorionic twins. In monozygotic twins, the mean risk assessment of the two fetuses was used. An invasive diagnostic procedure was offered when the risk was $\geq 1:270$ in either one of the fetuses.

Results From February 2007 to June 2011, 447 twin pregnancies were enrolled in this study. There were 402 (89.9%) dichorionic and 45 (10.1%) monozygotic twins. In dichorionic twins, mean crown-rump length (CRL) was 63.9 mm; median NT multiples of the median (MoM) was 0.97; median B-hCG was MoM 1.74; median PAPP-A was 1.72. In monozygotic twins, mean CRL was 61.9 mm; median NT MoM was 0.98; median B-hCG MoM was 1.44; and median PAPP-A was 1.51. Two pregnancies with Down syndrome were detected by first trimester screening, both in dichorionic twins. The false positive rate was 5.7% (95% confidence interval 4.1–7.3) and 4.4% (95% confidence interval 0.1–8.8%) in dichorionic and monozygotic twins, respectively.

Conclusions The combined test in twins appears to be a good method for Down syndrome screening with a high detection rate and an acceptable false-positive rate. © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Funding sources: None

Conflicts of interest: None declared

INTRODUCTION

The incidence of twin pregnancies is increasing as a result of the widespread use of assisted reproduction technologies and the increasing maternal age. Because the rate of autosomal trisomy increases with maternal age, multiple pregnancies are at a higher risk than the general population.¹ Although amniocentesis or chorionic villus sampling (CVS) are recommended in cases at high risk for fetal aneuploidy, in multiple pregnancies invasive procedures are more challenging and women who conceive after assisted reproduction technologies (ART) are usually more reluctant to accept invasive testing. For all these reasons, the aneuploidy-screening test should be as accurate as possible in twin pregnancies.

In the past, the counselling of patients regarding the risk of fetal aneuploidy was based on maternal age alone. In singleton pregnancies, this counselling has been refined because of the addition of first and second trimester biochemistry and aneuploidy ultrasound markers. In patients with multiples,

counselling regarding the risk of fetal chromosomal abnormalities is far more complex because of several issues. Defining 'advanced maternal age' in these women is complicated not only because there is more than one fetus, but also because zygosity has an impact on risk.^{2,3} A noninvasive method of determining zygosity in dichorionic twin pregnancies does not currently exist, making accurate counselling of these patients impossible. The addition of maternal serum markers to risk assessment is difficult because it is not possible to determine the contribution of each individual fetus to the analyses values.⁴ Risk assessment in twin pregnancies with nuchal translucency (NT) does provide fetus-specific risk. The detection rate with the use of maternal age and NT has been described as similar to that in singleton pregnancies, although the false-positive rate is higher.⁵

Not many reports have been published about the benefit of the combination of maternal age, maternal serum biochemistry and nuchal translucency for the screening for Down syndrome

in twin pregnancies.^{6–10} Our aim is to describe the performance of first-trimester combined risk assessment in twin pregnancies and compare these results to the performance of the test in singletons in our population.

MATERIALS AND METHODS

From February 2007 to June 2011, 894 twin fetuses and 9868 singleton pregnancies attending our unit for first trimester screening were enrolled in this study. Exclusion criteria were pregnancies with missing data or an uncompleted follow up.

Both in singletons and in twins, biochemical risk assessment for Down syndrome (maternal serum free beta-human chorionic gonadotrophin (free- β HCG) and pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A)) was performed between 8 and 13+6 weeks' gestation and NT scan was performed between 11 and 13 +6 weeks (crown–rump length (CRL) 45–84 mm), following the Fetal Medicine Foundation Guidelines.¹¹ The ultrasound examination was transvaginal, transabdominal or combined, when necessary. The risk assessment was calculated using the Combined Test in two steps (maternal age, maternal serum levels of free- β HCG and PAPP-A at 8 to 13+6 weeks' gestation and NT measurement at 11 to 13+6 weeks' gestation). When pregnancy was achieved with egg donors, the age of the egg donor was used.

Chorionicity was determined and was considered monochorionic in the presence of a single placenta and the absence of the lambda sign and was considered dichorionic when the placentas were not adjacent or the lambda sign was present.¹² In twin pregnancies, the larger of the two CRL measurements was used to estimate the overall gestational age of the pregnancy. Biochemistry values were determined using the Kryptor analyzer (BRAHMS®). These values were expressed as multiples of the median (MoM) adjusted for number of fetuses, maternal weight, history of chromosome anomalies, smoking habit and ethnicity. In case of multiple pregnancies the conversion to MoM was carried out after the correction for the presence of twins, as established by Spencer.¹³ Down syndrome combined test risk assessment was calculated using commercial software SsdwLab5, with calculation of the specific risk for each fetus. Risk assessment for individual fetuses was provided in dichorionic twins. In

monochorionic twins, the mean risk assessment of the two fetuses was used.

An invasive diagnostic procedure was offered when the risk was 1:270 or greater in either fetus. Fetal chromosomal status was determined either by amniocentesis or CVS when requested or by phenotypic evaluation after delivery by the attending paediatrician. Outcome variables were retrieved from a review of computerized medical records. If the pregnancy was not followed and delivered at our centre, data were obtained by phone enquiry.

Continuous variables were compared using ANOVA (analysis of variance) test or Kruskal–Wallis test, depending on whether they complied with the assumptions of normality and equality in variances. Categorical variables were compared using the χ^2 Pearson test.

All tests were bilateral with a level of significance $\alpha=0.05$. Performance of the test was expressed as detection rate (DR), specificity, false positive rate (FPR), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV). FPRs were compared with the use of 95% confidence interval (CI). Screening strategies in singletons and dichorionic twins were compared using the area under the ROC (receiver operating characteristic) curve and its CI.

RESULTS

During the study period (February 2007–June 2011), 447 twin pregnancies and 9816 singletons fulfilled the inclusion criteria. Fifty-four cases were excluded from the study.

Among the multiple pregnancies, 402 (89.9%) were dichorionic and 45 (10.1%) were monochorionic. The mean maternal age was 35 years (range 20–50) for dichorionic twins and 33 for monochorionic twins (range 27–40), with 44% and 20% over 36 years in dichorionic and monochorionic twin gestations, respectively. The characteristics of the study population can be seen in Table 1.

Among twin gestations undergoing the combined test, 5.8% (52/894) had results indicating high risk for Down syndrome (cut off: 1/270): 48 cases were in dichorionic and 4 in monochorionic twin pregnancies. Of them, 39 fetuses (75%) were in women older than 36 years. After counselling, 12 women declined invasive diagnostic test. Amniocentesis

Table 1 Patients' characteristics

	Dichorionic twins	Monochorionic twins	Singletons	p-value
Mean maternal age (years \pm SD)	35.4 \pm 4.5	34.2 \pm 3.2	33.5 \pm 4	0.001
Mean gestational age maternal serum sampling (days \pm SD)	67.2 \pm 8.8	70.7 \pm 7.9	66.9 \pm 9	0.300
ART conception (%)	30.3	2.2	4.8	0.001
Mean maternal weight (Kg \pm SD)	62.7 \pm 10.9	61 \pm 9.5	62.1 \pm 10.3	0.344
Cigarette smoking (%)	10.9	13.3	10.7	0.289
Ethnicity (%)				
Caucasian	99.2	100	98.9	0.978
Non-Caucasian	0.8	0	1.1	
Mean CRL (mm \pm SD)	63.9 \pm 8.7	61.9 \pm 7.9	63.4 \pm 8.41	0.063
Median NT MoM(mm)	0.97	0.98	0.97	0.460

SD, standard derivation; CRL, crown rump length; NT, nuchal translucency.

Table 2 First trimester B-hCG, PAPP-A and NT in unaffected fetuses

	Dichorionic twins	Monochorionic twins	Singletons	p-value
Median B-hCG MoM	1.74	1.44	0.97	0.01
Median PAPP-A MoM	1.72	1.51	0.96	0.03
Median NT MoM	0.97	0.98	0.97	0.460
Mean log ₁₀ B-hCG	0.26	0.20	-0.01	0.01
Mean log ₁₀ PAPP-A	0.24	0.17	-0.02	0.01
Mean log ₁₀ NT	-0.02	-0.02	-0.01	0.460
log ₁₀ standard deviation B-hCG	0.23	0.29	0.25	0.389
log ₁₀ standard deviation PAPP-A	0.24	0.24	0.25	0.88

NT, nuchal translucency; MoM, multiples of the median; B-hCG, free beta-human chorionic gonadotrophin; PAPP-A, pregnancy-associated plasma protein A.

Table 3 Median markers values observed in spontaneous versus assisted conceived chromosomally normal twin pregnancies

	Spontaneous conception (n=649)	Assisted conception (n=245)	p-value
Median B-hCG MoM	1.96	2.00	0.32
Median PAPP-A MoM	1.72	1.84	0.25
Median NT MoM	0.98	0.97	0.96

n, number of cases; MoM, multiples of the median; NT, nuchal translucency; B-hCG, free beta-human chorionic gonadotrophin; PAPP-A, pregnancy-associated plasma protein A.

Table 4 Combined Test results in dichorionic, monochorionic and singleton fetuses

	DS risk ≥ 270	DR	FPR	PPV	NPV
Dichorionic	48/804	100%	5.7%	4.2%	99.9%
Monochorionic	4/90	—	4.4%	—	99.9%
Singletons	632/9868	94.1%	5.9%	8.1%	99.9%

DS, Down syndrome; DR, detection rate; FPR, false positive rate; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; CI, confidence interval.

was performed in 38 women undergoing invasive diagnostic testing and CVS in 2. There was one fetal loss because of a chorioamnionitis post amniocentesis. In the remaining cases, the pregnancy continued for at least 28 days after the procedure.

Down syndrome was identified in two fetuses of two different pregnancies; both of them were dichorionic twins and in patients older than 36 years. In case 1, maternal age

was 38 years old, the affected fetus had NT of 2.6 mm, CRL of 51 mm, free β-hCG was 126, 1.4 MoM and PAPP-A was 0.93, with a calculated Down syndrome risk of 1/9. In case 2, maternal age was 37 years old, the fetus had NT of 3.2 mm, CRL of 72 mm, free-β-hCG of 1.52 MoM, PAPP-A of 0.79 MoM, with a calculated Down syndrome risk of 1/34. In case 1, the patient declined the offer of an invasive diagnostic test and Down syndrome was diagnosed at birth. In case 2, the mother elected to undergo embryo reduction of the affected fetus. The surviving twin progressed to a normal healthy delivery.

In singleton pregnancies, Down syndrome was identified in 52 fetuses.

If we compare biochemical markers and NT between unaffected fetuses, in dichorionic, monochorionic and singletons, we observe significant differences in β-hCG and PAPP-A values, but not in NT measurement (Table 2).

No significant differences were found in either serum analyses or NT measurements between the spontaneous and the assisted conceptions for the chromosomally normal twin pregnancies (Table 3).

In our global population, combined test for the detection of Down syndrome had a DR of 98.1%, FPR of 5.9%, PPV of 7.7% and NPV of 99.9%. In Table 4 we show the results of the combined test in dichorionic, monochorionic and singleton fetuses.

In twin pregnancies, the FPR of the combined test per fetus was 5.7% (95% CI 4.1–7.3) in dichorionic and 4.4% (95% CI 0.1–8.8%) in monochorionic twins. The FPR was higher in singletons: 5.9 (95% CI 5.5–6.4). If we distinguish, between patients older/younger than 36 years old, results are worse in the older patient group (Table 5).

Table 5 False positive rate per fetuses in monochorionic twins, dichorionic twins and singletons, depending on the age of the mother

FPR per fetus (95% CI)	Dichorionic twins	Monochorionic twins	Singletons
Global	5.7 (4.1–7.3)	4.4 (0.1–8.8%)	5.9 (5.5–6.4).
≤35 years old	2.2 (0.9–3.6)	4.2 (0–8.9)	3.5 (3–3.9)
>36 years old	10.2 (7–13.3)	5.6 (0–17)	11.6 (10.5–12.8)

FPR, false positive rate; CI, confidence interval.

Table 6 ROC curve in dichorionic twins and singletons

	AUC	95% CI
Dichorionic twins	0.998	0.995–1
Singletons	0.991	0.987–0.995

ROC, receiver operating characteristic curve; AUC, area under the curve; CI, confidence interval.

Combined test appeared to be an effective screening strategy, both in dichorionic twins and singletons (Table 6). Because we had no cases of Down syndrome in monochorionic twins, we could not establish the ROC curve in this group.

DISCUSSION

In patients with monochorionic twins, the designation of 'advanced maternal age' is the same as for women with a singleton. However, defining 'advanced maternal age' in women with dizygotic twins, triplets and high-order multiples is far more complex.^{2,3,14} Advanced age is a very poor screening tool in twin pregnancies, because of the difficulty of determining the age-specific risk in twins and its high false positive rate. Since 2004, the International Down Syndrome Screening Group¹⁵ has not considered advanced maternal age an indication for invasive procedures. This is especially important in twin pregnancies, where the presence of advanced maternal age is frequent. In our study, 44.5% and 20% in dichorionic and monochorionic pregnancies, respectively, were older than 36 years old. Moreover, 30.3% of dichorionic twin pregnancies were conceived after ART, signalling increased maternal concern for risk of pregnancy loss because of genetic diagnostic procedures.

The addition of maternal serum markers (first or second trimester maternal serum markers) to risk assessment is difficult because they cannot identify the fetus at risk. For instance, the detection rate achieved by second-trimester biochemistry is lower than in singletons because the unaffected co-twin can mask the abnormal serum values of the affected twin.¹⁶

First trimester ultrasound NT measurement associated with maternal age has the additional advantage of allowing calculation of the specific risk for each twin. In a previous series reported by our group¹⁷ the sensitivity of NT screening in multiple pregnancies was 85.7% and 79.6% in singletons, with a false positive rate of 3.5% in twins and 4.8% in singletons.

In this present series of 447 twin sets, the use of the combined test for the screening of trisomy 21 enabled the detection of all cases of Down syndrome with a false positive rate of 5.7% in dichorionic fetuses and 4.4% in monochorionic fetuses (cut off $\geq 1/270$). Wide CIs were observed around the FPR because of the small number of affected fetuses. The performance of this screening method appears to be as good as in singletons, or even better in the case of dichorionic twin pregnancies, as shown by the ROC curves. Our series is the first one describing a false positive rate lower in twins than in singleton pregnancies. There are a few series in the literature about the performance of the combined test in twin pregnancies (Table 7).^{6–10} Our results are comparable to those reported previously. Note the decrease in the FPR in the latest studies. The increase in specificity in the publications of Gonc e *et al.*^{6,8} and our present series could be due to the performance of the combined test in two steps. We believe that the sooner maternal serum sampling is performed, the more accurate these markers seem to be for the screening of Down syndrome.¹⁸ The decrease in the FPR is important because it leads to a decreased need for invasive procedures. Invasive techniques are more difficult in twin pregnancies and are associated with a higher risk of fetal loss.

Regarding the biochemical markers, β -hCG and PAPP-A values in our series followed a slightly different distribution compared with those published by Spencer.¹⁹ We recommend that every centre establishes its own biochemical marker distributions to apply a correcting factor depending on the chorionicity for the screening of Down syndrome in twin pregnancies. We previously reported²⁰ the distribution of the serum markers in monochorionic and dichorionic twin pregnancies in our population. In our series, PAPP-A and β -hCG MoM do not rise to twice the level of unaffected

Table 7 Performance of the combined test in twin pregnancies. Review of the literature

	N	>35 years (%)	Mean GA at material serum sampling (days)	N Down syndrome	Median B-hCG MoM (unaffected twins)	Median PAPP-A MoM (unaffected twins)	Median NT MoM (unaffected twins)	FPR (%) (per fetus)	DR (%)
Gonc�e <i>et al.</i> ⁶	161	15 (>37)	77	4	1.72	2.01	1.05	3.5	100
Chasen <i>et al.</i> ⁷	519	46.5	—	7	0.97	1.12	—	7	100
Gonc�e <i>et al.</i> ⁸	100	36 (>34)	77	3	1.57	1.96	1.02	3.6	100
Spencer <i>et al.</i> ⁹	206	—	85	4	2.15	1.93	—	6.9	75
Orlandi <i>et al.</i> ^{10a}	30	—	84	7	1.72	1.61	0.9	10.6	—
Current study	447	30.6%	67.2 DC/70.7 MC	2	174 DC/1.44 MC	1.72 DC/1.51 MC	0.97 DC/0.98MC	5.7 DC/4.4MC	100

DC, dichorionic; MC, monochorionic; FPR, false positive rate; DR, detection rate; GA, gestational age; MoM, multiples of the median; N, number of cases; NT, nuchal translucency; B-hCG, free beta-human chorionic gonadotrophin; PAPP-A, pregnancy-associated plasma protein A.

^aTwin pregnancies conceived with assisted reproduction.

Table 8 Biochemical serum markers and nuchal translucency in spontaneous gestations and assisted conceptions in singletons²⁴

	Assisted conceptions (n = 638)	Spontaneous gestations (n = 9756)
Mean maternal age (years ± SD)	35.02 ± 3.6	33.2 ± 3.7
>35 years	50.9%	31.3%
BhCG MoM (median and range)	0.83*(0.03–5.13)	1.05(0.04–11.37)
PAPPA MoM (median and range)	0.95*(0.17–5.26)	0.92(0.01–7.38)
NT MoM (median and range)	0.97(0.31–4.74)	0.97(0.25–6.02)

SD, standard deviation; NT, nuchal translucency; BhCG, free beta-human chorionic gonadotrophin; PAPPA, pregnancy-associated plasma protein A; MoM, multiples of the median; N, number of cases.

**p* < 0.05.

singletons. This deviation could be due to an earlier sampling for biochemical markers in our two-step screening approach.

In our twins' series, we did not find an increase of NT measurement in the group of monochorionic twins, nor any differences in NT measurements in spontaneous gestations and ART conceptions, unlike previously reported.^{10,21–23} Moreover, in twins no significant differences were found in

serum analyses between the spontaneous and the ART conceptions for the chromosomally normal pregnancies. On the contrary, as our group previously reported, we did find significant differences in maternal biochemical markers in singletons²⁴ (Table 8). We believe these different results are due to the smaller number of cases in twin pregnancies.

To improve the performance of the screening, our group is studying the possibility of adding another marker as (ductus venosus pulsatility index) either in a combined or a contingent test.

ACKNOWLEDGEMENTS

Under the auspices of the Càtedra d' Investigació en Obstetrícia i Ginecologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

WHAT'S ALREADY KNOWN ABOUT THIS TOPIC?

- First trimester screening in twins is more challenging than in singletons. Serum markers do not provide a specific risk for each fetus and nuchal translucency has a high false positive rate.

WHAT DOES THIS STUDY ADD?

- Combined test in twin pregnancies has a high sensitivity with low positive rates.

REFERENCES

1. Neveux L, Palomaki G, Knight G, Haddow J. Multiple marker screening for Down Syndrome in twin pregnancies. *Prenat Diagn* 1996;16:29–34.
2. Meyers C, Adam R, Dungan J, Prenger V. Aneuploidy in twin gestations: when is maternal age advanced? *Obstet Gynecol* 1997;89:248–51.
3. Odibo AO, Elkousy MH, Ural SH. Screening for aneuploidy in twin pregnancies: maternal age- and race-specific risk assessment between 9–14 weeks. *Twin Res* 2003;6:251–6.
4. Cleary-Goldman J, Berkowitz R. First trimester screening for Down syndrome in multiple pregnancy. *Semin Perinatol* 2005;29:395–400.
5. Sebire NJ, Snijders RJM, Hughes K, Sepulveda W, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies by maternal age and fetal nuchal translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:999–1003.
6. Goncé A, Borrell A, Casals E, Steinvarcel F, Serés A, Cararach V, Gratacós E. Cribado de aneuploidía en gestación gemelar: resultados de la aplicación del test combinado. *Prog Obstet Gynecol* 2008;51(10):577–85.
7. Chasen ST, Perni SC, Kalish RB, Chevernak FA. First trimester risk assessment for trisomies 21 and 18 in twin pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197:374.e1–3.
8. Goncé A, Borrell A, Fortuny A, Casals E, Martínez MA, Mercade I, Cararach V, Vanrell JA. First trimester screening for trisomy 21 in twin pregnancy: does the addition of biochemistry make an improvement? *Prenat Diagn* 2005;25:1156–61.
9. Spencer K, Nicolaides K. Screening for trisomy 21 in twins using first trimester ultrasound and maternal serum biochemistry in a one-stop clinic: a review of three years experience. *Br J Obstet Gynaecol* 2003;110:276–80.
10. Orlandi F, Rossi C, Allegra A, Krantz D, Hallahan T, Orlandi E, Macri J. First trimester screening with the free B-hCG, PAPP-A and nuchal translucency in pregnancies conceived with assisted reproduction. *Prenat Diagn* 2002;22:718–21.
11. Nicolaides KH, Brizot ML, Snijders RJM. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for fetal trisomy in the first trimester pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1994;101:782–6.
12. Sepulveda W, Sebire NJ, Huhes K, Odibo A, Nicolaides KH. The lambda sign at 10–14 weeks gestation as a predictor of chorionicity in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1996;7:421–3.
13. Spencer K. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester using free β-hCG and PAPP-A, combined with fetal nuchal translucency thickness. *Prenat Diagn* 2000;20:91–5.
14. Rodis JF, Egan JF, Craffey A. Calculated risk of chromosomal abnormalities in twin gestations. *Obstet Gynecol* 1990;76:1037–41.
15. Ferguson Smith M, Arbusova S, Benn P, Canick J, Cuckle H, Fortuny A, *et al.* A position statement from the scientific committee of the International Down Syndrome Screening Group. *Down Syndrome Screening*, 2004.
16. Muller F, Dreux S, Dupoizat H, *et al.* Second trimester Down syndrome maternal serum screening in twin pregnancies: impact of chorionicity. *Prenat Diagn* 2003;23:331–5.
17. Prats P, Torrents M, Muñoz A, Echevarria M, Rodríguez MA. First trimester nuchal translucency screening for fetal aneuploidies in multiple pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;32:364 (OP16.02).
18. Borrell A, Casals E, Fortuny A, Farré MT, Goncé A, Sánchez A, *et al.* First-trimester screening for trisomy 21 combining biochemistry and ultrasound at individually optimal gestational ages. An interventional study. *Prenat Diagn* 2004;24:541–5.
19. Spencer K, Kagan KO, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 in twin pregnancies in the first trimester: and update of the impact of chorionicity on maternal serum markers. *Prenat Diagn* 2008;28:49–52.
20. Prats P, Rodríguez I, Nicolau J, Comas C. Early first-trimester free B-hCG and PAPP-A serum distributions in monochorionic and dichorionic twins. *Prenat Diagn* 2012;32:64–9.

21. Cheng PJ, Huang SY, Shaw SW, Hsiaou CH, Kao CC, Chueh HY, Hsieh TT. Difference in nuchal translucency between monozygotic and dizygotic spontaneously conceived twins. *Prenat Diagn* 2010;30:247–50.
22. Sperling L, Kiil C, Larsen L, *et al.* Detection of chromosomal abnormalities, congenital abnormalities and transfusion syndrome in twins. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007;29:517–26.
23. Sebire NJ, Souka A, Skentou H, Geerts L, Nicolaides KH. Early prediction of severe twin-to-twin transfusion syndrome. *Hum Reprod* 2000;15:2008–10.
24. Rodriguez MA, Comas C, Echevarria M, Rodriguez I, Sabria J. Estrategias para mejorar el cribado de síndrome de Down: experiencia en el Instituto Dexeus (Barcelona). *Diagn Prenat* 2011;22(2):41–50.