

Bioquímica clínica de la gestación

Por J. J. ÁLVAREZ MILLÁN y E. HERRERA CASTILLÓN

1. Bioquímica de las hormonas placentarias. 2. Gonadotropina coriónica (hCG). 3. Alfa-fetoproteína. 4. Estriol. 5. Despistaje prenatal en el suero materno.

La gestación es un estado fisiológico que altera profundamente diversos procesos metabólicos y bioquímicos. Estos cambios se producen debido a determinadas interacciones hormonales que afectan tanto a la placenta como al feto y a la madre. En este capítulo se revisa la bioquímica de las hormonas placentarias y los parámetros que se utilizan para la detección, seguimiento o pronóstico de la gestación, así como la aportación de la bioquímica clínica en el despistaje prenatal de defectos fetales.

1. BIOQUÍMICA DE LAS HORMONAS PLACENTARIAS

La placenta produce un gran número de hormonas esteroideas y peptídicas (Cuadro 33-1). Entre las esteroideas se encuentran la progesterona, el estradiol, la estrona y el estriol y, entre las peptídicas, la gonadotropina coriónica (hCG) y la somatomotropina coriónica (hCS). La placenta secreta la mayoría de sus productos a la circulación materna y sólo una pequeña proporción de ellos alcanza la circulación fetal. Esta secreción preferencial se explica por la proximidad anatómica que existe entre los vasos sanguíneos mater-

nos y los lugares donde se sintetizan los productos placentarios.

En general, la producción hormonal de la placenta aumenta proporcionalmente con el incremento de su masa. Por ello, la concentración de hormonas placentarias aumenta en la sangre materna a medida que crece la placenta a lo largo de la gestación; la hCG, cuyo pico de concentración se produce al final del primer trimestre, no deja de ser una excepción.

Cuadro 33-1. Hormonas sintetizadas por la placenta

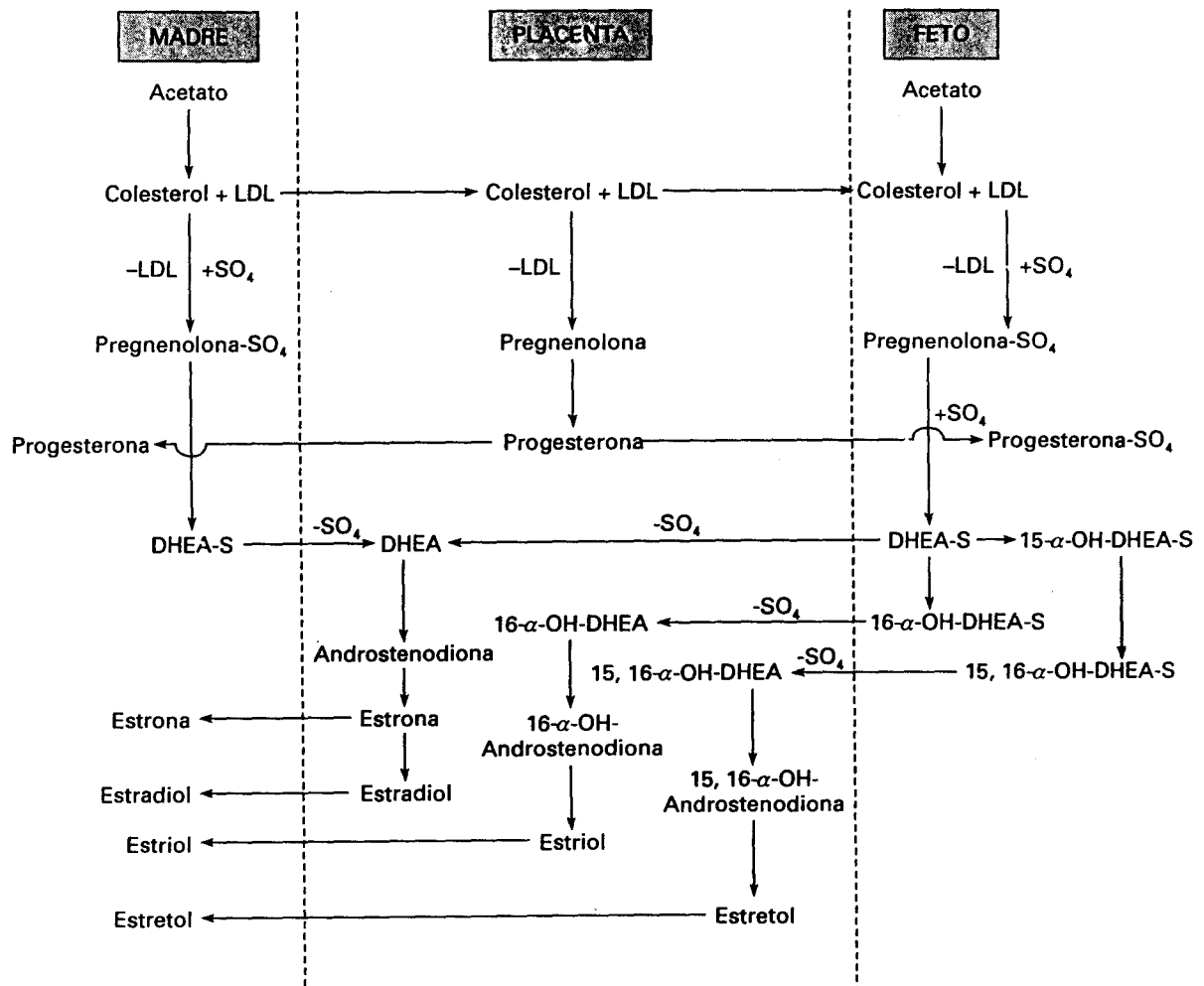
<i>Esteroides</i>	<i>Peptídicas</i>
— Progesterona.	— Gonadotropina coriónica.
— 17- β -estradiol.	— Somatomotropina coriónica.
— Estrona.	— Corticotropina coriónica.
— Estriol.	— Tirotropina coriónica.
— Estretol.	— GnRH.
	— Inhibina.
	— CRH.
	— Otras 20 proteínas específicas de la gestación.

1.1. Esteroides placentarios

La placenta produce una amplia variedad de hormonas esteroideas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la placenta carece de las enzimas necesarias para la síntesis de colesterol, por lo que el colesterol procedente del plasma materno es el principal precursor de la producción de progesterona placentaria. Además, la biosíntesis de los estrógenos por la placenta difiere también de la de los ovarios, porque la placenta no tiene 17-β-hidroxilasa.

La Figura 33-1 ilustra de forma resumida la biosíntesis de la progesterona y de los es-

trógenos en la placenta y el feto, y su relación con esta vía en la madre. El colesterol materno, transportado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en forma de colesterol esterificado, es captado por los sincitiotroblastos de la placenta mediante receptores LDL, y una vez en el interior celular se hidroliza a colesterol libre en los lisosomas. En las células sincitiotroblásticas de la placenta, el colesterol se convierte en pregnenolona, por acción de enzimas mitocondriales (complejo 22, 23 desmolasa). La mayor parte de la pregnenolona se transforma, finalmente, en progesterona mediante la acción del complejo 3β-hidroxiesteroide des-



DHEA = dehidroepiandrosterona; DHEA-S = sulfato de dehidroepiandrosterona; LDL = lipoproteínas de baja densidad.

Figura 33-1. Vías esteroidogénicas en la unidad fetoplacentaria en relación con las de la madre.

hidrogenasa- $\delta 4,5$ isomerasa. Aproximadamente, el 90 % de la progesterona así sintetizada se secreta a la circulación materna y el 10 % restante hacia el feto. Aunque este último posee la actividad enzimática suficiente para la síntesis de pregnenolona, carece del último complejo enzimático necesario para la producción de progesterona. Por eso, ya que la progesterona no depende de enzimas fetales, es un pobre indicador del estado fetal y está más relacionada con la función placentaria.

En el feto, el colesterol y la pregnenolona se sulfatan rápidamente por una enzima suprarrenal, produciéndose la inactivación biológica de estos esteroides. Este paso de sulfatación parece ser un mecanismo protector que asegura que el feto no se expone a concentraciones elevadas de esteroides activos. El sulfato de pregnenolona se convierte rápidamente en sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) por enzimas suprarrenales del feto, la 17- α -hidroxilasa y la 20,21 desmolasa. El DHEA-S puede hidroxilarse en el hígado fetal en la posición 16- α , 15- α o ambas, y todos estos andrógenos terminan alcanzando la placenta, donde se captan.

En la placenta, el sulfato tiene que eliminarse antes de que el complejo 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa convierta la dehidroepiandrosterona (DHEA) o la dehidroepiandrosterona hidroxilada en androstenodiona o androstenodiona hidroxilada, respectivamente. Estos andrógenos se aromatizan a estrona (E1), 16- α -OH estrona, 16- α ó 15- α -OH estrona, y después se transforman en estradiol (E2), estriol (E3) o estreol (E4) mediante la hidroxilación placentaria en 17 β . Mientras que el DHEA-S materno aporta un 40 % de los precursores necesarios para la síntesis de estrona, el estradiol y el estriol se sintetizan de forma predominante utilizando precursores fetales, ya que el hígado materno tiene escasa capacidad para hidroxilar en las posiciones 15- α ó 16- α . La mayoría de los estrógenos formados en la placenta se libera finalmente a la circulación materna, por lo que la concentración de hormonas esteroideas en ésta aumenta de forma espectacular

a lo largo de la gestación. Así, en mujeres no gestantes, los ovarios secretan entre 100 y 600 $\mu\text{g/d}$ de estradiol, siendo alrededor de un 10 % metabolizado a estriol. Sin embargo, al final de la gestación, la placenta produce entre 50 y 150 mg/d de estriol y entre 15 y 20 mg/d de estradiol y estrona. Esta es una de las razones por las que se han utilizado las concentraciones de estriol en el tercer trimestre de la gestación como indicadores del bienestar fetal. Ahora está en desuso, pero la concentración de estriol entre las semanas 16 y 18 de la gestación puede servir en la predicción de trisomía 21 en el feto.

La capacidad esteroideogénica de la placenta comienza de forma muy temprana durante la gestación, aunque la producción de progesterona placentaria sólo soporta de forma exclusiva el mantenimiento de la gestación 35-47 días después de la ovulación. En la fase gestacional anterior a esos hechos, la gestación depende de la progesterona producida por el cuerpo lúteo.

La función de los estrógenos y de la progesterona es múltiple, y en el capítulo anterior ya se comentaron sus efectos en los cambios metabólicos que ocurren en la madre. A su vez, se necesita progesterona para el mantenimiento de la gestación por su efecto supresor de las contracciones uterinas; por otro lado, también influye en el desarrollo de la glándula mamaria, aunque suprime la lactación por inhibición de la síntesis de lactosa. Además, afecta a la homeostasis de la glucosa y al metabolismo del agua, y muestra una cierta actividad inmunosupresora. Los estrógenos influyen en el crecimiento del útero, en el flujo sanguíneo, y en el metabolismo y crecimiento de la glándula mamaria. Tanto los estrógenos como la progesterona modulan la actividad de otros factores implicados en la iniciación del parto, como las prostaglandinas y la oxitocina. Por otra parte, la producción de hormonas esteroideas placentarias está influida por la acción de ciertas hormonas peptídicas como la hCG y por otros factores como las hormonas hipotálamoideas de la placenta, los factores de crecimiento y las prostaglandinas.

1.2. Hormonas placentarias peptídicas

Existen muchas proteínas que se producen de forma específica durante la gestación. Además de las hormonas peptídicas indicadas en el Cuadro 33-1, la placenta sintetiza algunas enzimas y otras proteínas cuyo papel fisiológico no se ha descrito todavía. Estas proteínas no se expresan de manera exclusiva durante la gestación, sino que simplemente su síntesis aumenta espectacularmente. Las más conocidas son la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la somatomatotropina coriónica (hCS). Los aspectos fisicoquímicos y el significado de la hCG se tratan más adelante.

La somatomatotropina coriónica humana (hCS), también conocida como lactógeno placentario humano (hPL), es un polipéptido monomérico, de 191 aminoácidos, con dos puentes disulfuro intramoleculares, que tiene un peso molecular de 22 279 dalton. Tiene una elevada homología con la hormona de crecimiento (GH) (96 %) y algo menor con la prolactina (67 %). Una familia de 5 genes del cromosoma 17 codifica la GH y la hCS. La hCS se sintetiza por los sincitiotrofoblastos de la placenta, siendo su concentración paralela a la masa de la placenta a lo largo de toda la gestación, observándose la producción máxima en el último período de la misma. La secreción placentaria en esa fase es de 1 a 2 g/d, lo que supone el 10 % de la síntesis proteica placentaria total. Por tanto, la concentración de hCS parece reflejar la función placentaria, y su secreción a la circulación materna induce cambios metabólicos, como la movilización de los ácidos grasos, la resistencia insulínica, la disminución de la utilización de la glucosa y el incremento de la disponibilidad de aminoácidos, mediante la disminución de la utilización materna de proteínas. Además, la actividad lactógena de la hCS sugiere también un sinergismo con la prolactina y los esteroides en la preparación de la glándula mamaria para la lactancia. Aunque las concentraciones plasmáticas de la hCS se han utilizado para evaluar el bienestar fetal, actualmente no existen razones

clínicas que aconsejen su determinación. La placenta también sintetiza péptidos similares a los producidos por la hipófisis: ACTH coriónica, hormona estimulante de melanocitos (MSH), β -endorfinas y β -lipotropinas.

1.3. Actividades hipotalámicas de la placenta

Durante los últimos años, numerosos estudios han establecido que los tejidos trofoblásticos producen sustancias con actividad liberadora/inhibidora similares a las producidas por el hipotálamo, denominadas globalmente «actividades hipotalámicas». Aunque se acepta la hipótesis de que la producción de las hormonas clásicas de la placenta se controla mediante un sistema paracrino, este sistema de retroalimentación requiere una definición clara. Un ejemplo de este grupo es la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH coriónica) humana, que se localiza en el citotrofoblasto de la placenta, al igual que otras hormonas de este tipo. Esta hormona estimula la producción de hCG, que a su vez afecta la esteroidogénesis de la placenta, mediante el estímulo de la síntesis de estrógenos y de progesterona. A su vez, los estrógenos pueden inhibir la GnRH, constituyendo así un sistema de retroalimentación, en el que participa también la inhibina. Esta glucoproteína, miembro de la superfamilia del TGF- β (*transforming growth factor- β*), está compuesta de dos subunidades, α y β , que son necesarias para manifestar sus actividades funcionales, entre las que se encuentra la supresión de la síntesis y secreción de FSH. Durante la gestación, la inhibina circulante se origina en los trofoblastos de la placenta, y su secreción está ligada a la de la hCG, ya que, en el último tercio de la gestación, la hCG estimula la producción de inhibina y ésta suprime la secreción de hCG. El papel de la inhibina se pone de manifiesto por la existencia de una influencia de la edad neonatal sobre la concentración sérica materna de inhibina y porque las gestaciones anormales se asocian con concentraciones altas de inhibina en el plasma materno.

Últimamente ha adquirido una gran notoriedad la hormona liberadora de corticotropina (CRH), desde que se ha demostrado que sus concentraciones en el plasma materno se elevan muy pronto en aquellas gestantes que tendrán partos prematuros, y están bajas en aquellas otras con partos tardíos. Dado que la placenta es la principal fuente de la CRH circulante durante la gestación, se ha sugerido que estos resultados pueden reflejar la actividad de un reloj placentario, que controla la longitud de la gestación y, por tanto, puede indicar la posible prematuridad del parto, con unas posibles consecuencias clínicas de gran impacto, dado que entre el 7 y el 10 % de todos los embarazos presenta este problema, generando aproximadamente el 70 % de la mortalidad y morbilidad neonatal temprana.

2. GONADOTROPINA CORIÓNICA (hCG)

En los últimos años se ha producido una enorme avalancha de información sobre esta hormona, tanto en cuanto a su utilidad clínica como en las metodologías para su determinación. De ser una mera «prueba de embarazo», ha evolucionado hacia una sofisticada herramienta diagnóstica que ayuda en la diferenciación de un amplio espectro de enfermedades.

2.1. Aspectos estructurales

La hCG es una glucoproteína formada por dos polipéptidos unidos por enlaces no covalentes: las subunidades α y β . Cada subunidad aislada carece de actividad biológica, pero la adquiere al unirse formando el dímero. La hormona intacta o completa se representa como hCG, mientras que la designación β -hCG se emplea para indicar específicamente la subunidad. Las cadenas polipeptídicas contienen cantidades variables de hidratos de carbono, como D-galactosa, D-manosa y ácido acetilneuramínico, siendo este último esencial para la actividad biológica de la hormona.

La subunidad α -hCG es idéntica a la cadena α de otras hormonas polipeptídicas hipofisarias, como la hormona estimulante del tiroides o tirotrópina (TSH), la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Ello se debe a que existe un único gen en el cromosoma 6 que codifica la subunidad α de todas ellas. Esta subunidad contiene 92 aminoácidos, 2 cadenas de hidratos de carbono y 5 puentes disulfuro, con un peso molecular de 14 900 dalton. La subunidad β es la que otorga a cada una de estas hormonas sus características biológicas específicas. A su vez, la β -hCG, codificada por una familia de 7 genes presentes en el cromosoma 19, está compuesta por 145 aminoácidos, 6 cadenas de hidratos de carbono y 6 puentes disulfuro, y tiene un peso molecular de 23 000 dalton. Por tanto, el heterodímero completo de la hCG tiene un peso molecular aproximado de 37 900 dalton y una proporción de hidratos de carbono mayor que cualquier otra hormona humana (31 %). También existe una gran similitud entre la parte peptídica de las subunidades β de la hCG y de la LH, que parece deberse a que provienen de un gen ancestral común, donde se produjo una pérdida de 145 a 115 aminoácidos del gen de la β -LH. Esta semejanza estructural hace que la proteína de hCG sea difícil de distinguir analíticamente de la LH. Incluso algunas pruebas específicas para la subunidad β de la hCG poseen una reactividad cruzada significativa con la LH, dependiendo de la zona de la β -hCG contra la cual esté dirigido el anticuerpo. Los anticuerpos más específicos son aquellos que van dirigidos contra los 30 aminoácidos carboxiterminales de la subunidad β .

En el suero materno la hCG puede encontrarse de diversas maneras: hormona intacta, subunidades libres y parcialmente degradada. Todo ello complica enormemente la cuantificación de esta hormona.

2.2. Bioquímica y fisiología

La hCG se sintetiza en las células sincitiotrofoblásticas de la placenta durante la gesta-

ción. Sin embargo, en el varón y en las mujeres no gestantes, se observan pequeñas cantidades de esta hormona, que son de origen hipofisario y tienen secreción pulsátil. A su vez, los mRNA de las subunidades α y β se transcriben desde sus respectivos genes y posteriormente se traducen, siendo en el retículo endoplásmico rugoso donde tiene lugar la combinación espontánea de estas subunidades para su posterior secreción a la circulación de forma continua.

Aunque, entre la 8.^a y 10.^a semanas de gestación la síntesis de β -hCG alcanza su máxima actividad, la producción de β -hCG aumenta de forma progresiva en función de la masa de la placenta. La síntesis de β -hCG en los sincitiotrofbastos parece estar bajo regulación paracrina de la GnRH y de la inhibina que se producen en los citotrofbastos.

Durante las primeras semanas de la gestación, la hCG tiene una doble función: estimular la formación del cuerpo lúteo, que es donde se produce progesterona, y estimular la esteroidogénesis placentaria. Cuando la actividad placentaria alcanza su completo desarrollo entre los 35 y 47 días tras la ovulación, la segunda función de la hCG supera a la primera, y es entonces cuando las concentraciones de las hormonas esteroideas placentarias empiezan a aumentar de forma sustancial, incluso unas 2 semanas antes de que la concentración de hCG alcance su máximo. Otra función hormonal adscrita a la hCG es su acción tirotrópica, debido a que se une a los receptores de la TSH en el tiroides de la madre, pudiendo conllevar un aumento de su función tiroidea.

2.3. Métodos de análisis de la hCG

2.3.1. Métodos cualitativos

Para la determinación de la gonadotropina coriónica se han utilizado múltiples y diversos métodos: bioanálisis o análisis biológicos, análisis de receptor y análisis de inhibición de la aglutinación. Sin embargo, en la actualidad, las técnicas en uso son las inmunológicas.

En los primeros análisis biológicos se determinaba la respuesta del tejido gonadal a la hCG en animales experimentales: ratones, conejos y ranas (poco sensibles, 2000 a 5000 UI/L). Más tarde se utilizaron bioanálisis *in vitro*, que se basaban en la producción de esteroides por células gonadales en cultivo, tras la interacción de la hCG con su receptor de membrana. Los esteroides producidos se determinaban posteriormente y se relacionaban con la concentración de hCG del espécimen. Por tanto, estas pruebas se basaban en la actividad luteotrópica de la hCG y, además de ser lentas y tediosas, no podían distinguir entre LH y hCG.

Hasta hace relativamente poco tiempo, los métodos más utilizados para la determinación cualitativa de la hCG en los laboratorios clínicos eran los métodos de inhibición de la aglutinación de partículas de látex, o bien de inhibición de la hemaglutinación. Estos métodos podían dividirse en dos clases: los métodos en placa y los métodos en tubo. Los métodos cualitativos más recientes de detección de embarazo se han denominado «pruebas de concentración», ya que el espécimen se concentra en una pequeña superficie. Todos ellos son variaciones de enzimoanálisis de tipo sandwich. En la mayoría de los casos, estas pruebas son específicas para la hCG intacta, y se realizan en unos pocos minutos con límites de sensibilidad que oscilan entre 25 y 50 U/L. Muchas de estas pruebas cualitativas suelen dar resultados positivos poco después de la primera falta menstrual. La sencillez y rapidez con que se obtienen los resultados hace muy adecuados estos métodos para la detección de la gestación. Sin embargo, no hay que olvidar que estos procedimientos no son cuantitativos y, por tanto, pueden obviar el diagnóstico tanto de gestaciones muy tempranas como de gestaciones anómalas.

2.3.2. Métodos cuantitativos

El suero es el tipo de espécimen que se utiliza en las pruebas cuantitativas de la hCG. En estos métodos existen múltiples estrate-

gias, en función básicamente de los anticuerpos monoclonales utilizados: RIA anti- β -hCG, sandwich anti- β -hCG:anti- β -hCG, sandwich anti- β -hCG:anti- α -hCG, sandwich anti- β -hCG, C terminal:anti- β -hCG y sandwich anti-hCG:anti- β -hCG. Las técnicas sandwich que se utilizan en la detección de hCG son IRMA o IEMA. El límite de detección de estas pruebas se encuentra alrededor de las 2 U/L. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el reconocimiento de las diferentes formas en que se puede presentar la hCG (intacta, subunidades libres, parcialmente

degradada y otros fragmentos) varía de unas pruebas a otras, lo que complica enormemente la transferibilidad de los resultados. En la Figura 33-2 se pretende ejemplificar las diferentes maneras en que las subunidades libres de la hCG pueden influir sobre la cuantificación de la hCG.

Por tanto, las numerosas pruebas disponibles están limitadas principalmente por los anticuerpos que se emplean en cada método, y no hay que olvidar que aunque las subunidades β -hCG y β -LH son diferentes, existe la suficiente analogía entre ambos polipéptidos

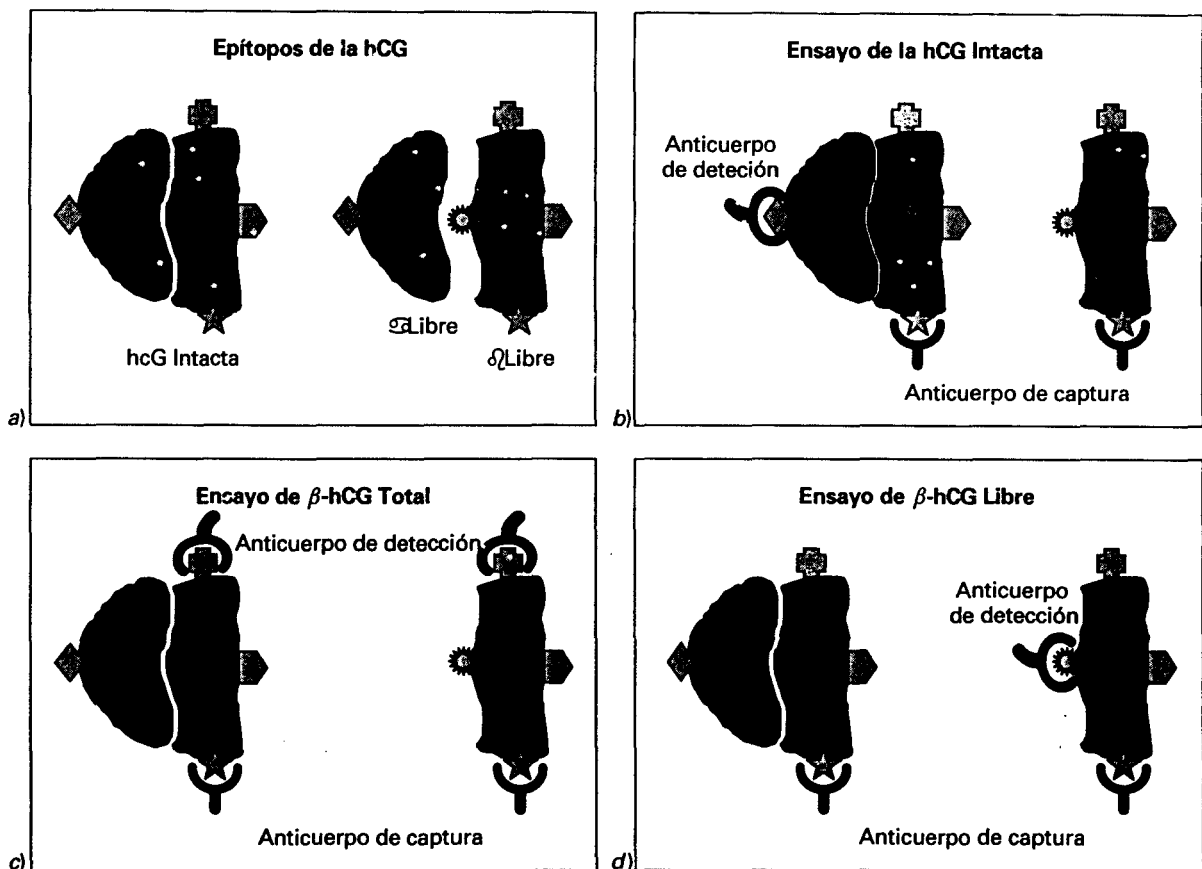


Figura 33-2. a) *Epítopos de la hCG:* algunos epítopos de la hCG quedan expuestos tanto en la molécula intacta como en las subunidades libres, mientras que otros sólo son accesibles a los anticuerpos monoclonales en el caso de las subunidades libres. b) *Prueba de la hCG intacta:* si en el método de hCG se utilizan anticuerpos de captura y de detección frente a epítopos presentes en subunidades diferentes, sólo se detecta la hCG intacta. c) *Prueba de β -hCG total:* si en el método de hCG se utilizan anticuerpos de captura y de detección frente a epítopos presentes sólo en la subunidad β , pero detectables también en la hCG intacta, se determina la cantidad total de subunidad β , que representa la suma de la libre más la presente en la molécula intacta. d) *Prueba de β -hCG libre:* si en el método se utilizan anticuerpos de captura y de detección frente a epítopos presentes en la misma subunidad β , pero estando uno de ellos expuesto sólo en la subunidad libre, se determina la cantidad de subunidad β , pero exclusivamente la de la fracción libre, y no la presente en la molécula intacta.

para presentar reactividad cruzada. Consecuentemente, las concentraciones elevadas de LH pueden dar resultados falsos positivos con algunos anticuerpos. Las elevaciones fisiológicas sustanciales de LH se producen en las mujeres menopáusicas y en la mitad del ciclo menstrual de las mujeres jóvenes.

La reproducibilidad intramétodo e intermétodos puede estar afectada por la heterogeneidad de las moléculas de hCG y la especificidad de las distintas pruebas para ellas. Se han hallado en orina, aunque no en el suero, de mujeres normales fragmentos inmunoreactivos de hCG. La variación del contenido de ácido siálico puede provocar la modificación de la reactividad de la hormona frente a un anticuerpo y, en consecuencia, afectar la exactitud de las pruebas.

Por otro lado, la calibración de las pruebas de hCG depende del material de referencia frente al que se han estandarizado. La mayoría de los inmunoanálisis actuales están calibrados frente a la primera Preparación de Referencia Internacional (1.^{er} PRI) o tercer Estándar Internacional (3.^{er} EI) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), como se le denomina actualmente. A pesar de todos estos esfuerzos para obtener resultados más uniformes, se ha detectado que la mayoría de los calibradores secundarios que se utilizan para cuantificar la hCG contiene fragmentos parcialmente degradados de hCG, lo que puede contribuir a la observación de resultados discordantes entre los diferentes métodos.

Por último, debe resaltarse que aunque los modernos inmunoanálisis tienen escasa reactividad cruzada con la LH, siempre hay que comprobar que las concentraciones elevadas de la misma no tienen influencia significativa sobre los resultados de hCG: el método debe ser sensible a bajas concentraciones de hCG y no presentar falsos positivos debidos a LH.

2.4. Aplicaciones clínicas

2.4.1. Diagnóstico de la gestación

Una de las principales aplicaciones de la hCG es su utilidad para el diagnóstico de em-

barazo, para lo que se emplean métodos cualitativos en orina. Los métodos de detección en orina suelen ser suficientes para diagnosticar una gestación normal cuando ha transcurrido alrededor de una semana desde la primera falta (50 U/L). Sin embargo, los métodos cualitativos en suero pueden detectar gestaciones con mayor antelación, y los métodos cuantitativos, que siempre son en suero, tienen ventajas para la prognosis en una gestación temprana. Así, la determinación seriada de las concentraciones de hCG en suero puede ser de gran ayuda ante la sospecha de gestaciones anómalas y para el diagnóstico o monitorización de pacientes con neoplasma trofoblástico gestacional u otros tumores productores de hCG.

Durante las primeras 8 semanas de embarazo, la concentración de hCG en suero materno aumenta de forma geométrica. Con métodos cuantitativos pueden medirse cantidades alrededor de las 5 U/L a los 8-11 días tras la concepción, tercera semana desde el último período menstrual, que aumentan a 25-50 U/L cuando llega la primera falta y que alcanzan un máximo alrededor de las 100 000 U/L, entre la octava y la décima semana. Posteriormente, la concentración de hCG comienza a declinar lentamente, tanto en suero como en orina, para disminuir un 90 % al final del segundo semestre. El suero de las mujeres gestantes normales en el primer trimestre contiene 96-98 % de hCG intacta, 1-3 % de subunidad β y 0-1 % de subunidad α . Durante el segundo trimestre, la síntesis de subunidades comienza a desequilibrarse: 92-98 % intacta, 1-7 % α y 0-1 % β , manteniéndose durante el tercer trimestre. Por otro lado, las concentraciones de hCG en las gestaciones gemelares se duplican.

2.4.2. Gestaciones anormales y ectópicas

Un embarazo ectópico se produce cuando la implantación del blastocito tiene lugar fuera del útero. Presenta un pronóstico reservado con respecto a la supervivencia de la mujer y su futuro potencial reproductivo. El

mayor reto con respecto al embarazo ectópico reside en establecer un diagnóstico lo más rápidamente posible e intervenir inmediatamente para evitar la rotura y la destrucción de la trompa de Falopio. El diagnóstico diferencial incluye una posible gestación ectópica si no se puede demostrar mediante ecografía un embarazo intrauterino. En estos casos, la cuantificación de la β -hCG puede ayudar a resolver el problema. Así, la ausencia de saco gestacional, cuando la concentración de hCG se encuentra por encima de 6500 U/L, normalmente a los 42 días de gestación, se asocia con gestación ectópica en el 87 % de los casos. Sin embargo, la utilidad clínica de este criterio se reduce al 40 % de los casos. Por otro lado, las concentraciones séricas de hCG en una gestación ectópica (tubárica) con frecuencia son de 2 a 2.5 veces menores que las halladas en una gestación uterina. Sin embargo, son difíciles de distinguir sólo sobre la base de los valores de hCG, debido a la gran superposición de estos valores con los de las gestaciones normales. Por eso, para mejorar la discriminación se suelen utilizar determinaciones seriadas de β -hCG, ya que en una gestación normal se observa una duplicación de su concentración cada dos días aproximadamente hasta la décima semana, mientras que en una gestación ectópica esa duplicación no se produce debido a una incapacidad para alcanzar la pendiente prevista de la síntesis de hCG, e incluso en algunos casos se producen disminuciones de la concentración de la hormona.

Además, tras la extirpación quirúrgica de un embarazo ectópico, ha de realizarse un seguimiento de las pacientes mediante determinaciones seriadas de β -hCG, hasta que vuelvan a los valores anteriores a la gestación, a fin de excluir la presencia de tejido trofoblástico ectópico no detectado. La desaparición de la β -hCG puede tardar hasta un mes, aunque la media es de unos nueve días aproximadamente.

Como se comentará más detalladamente, la determinación de hCG entre las semanas 16-18 de gestación ayuda a predecir el índice de riesgo de Síndrome de Down en el feto.

2.4.3. Enfermedad trofoblástica gestacional

La enfermedad trofoblástica gestacional (ETG) se produce aproximadamente en uno de cada 1000 embarazos, y el pronóstico respecto a la supervivencia es bueno si se realiza un diagnóstico precoz. La presentación clínica básica suele ser cuando una mujer presenta un útero aumentado de tamaño para su edad gestacional, una β -hCG elevada y ausencia de latido cardíaco fetal. Las mujeres con ETG presentan concentraciones de hCG superiores a las observadas en una gestación normal para la misma edad gestacional. Cuando se efectúa un seguimiento de las concentraciones de hCG previas al tratamiento, éstas caen a una meseta al final del primer trimestre, y después continúan aumentando en proporción al número de células trofoblásticas. Tras la expulsión del útero, debe efectuarse un seguimiento semanal de las concentraciones de β -hCG, hasta que ya no se detecten y después durante un año con carácter mensual.

En estos casos, en vez de cuantificar la β -hCG total puede ser más útil la determinación de β -hCG libre o, mejor aún, el cociente β -hCG libre/ β -hCG total. Este cociente es más elevado en la enfermedad trofoblástica y se correlaciona con el tipo de ETG que presenta la paciente. Así, se ha demostrado que la proporción es más baja en las pacientes con mola hidatidiforme que en aquellas con coriocarcinoma, correlacionándose con el grado de inmadurez o diferenciación de la célula trofoblástica.

La hCG también se usa en la monitorización de pacientes con cáncer de células germinales y de otros tumores productores de hCG.

3. ALFAFETOPROTEÍNA

La determinación de las concentraciones de α -fetoproteína (AFP) en suero materno o en líquido amniótico se utiliza para la detección prenatal de anomalías fetales. Su empleo en el diagnóstico y seguimiento de cier-

tos tipos de tumores no se tratará en este capítulo.

3.1. Metabolismo y fisiología

El descubrimiento de la AFP en suero fetal fue documentado por primera vez por Bergstrand y Czar en 1956. La síntesis de la AFP se inicia muy precozmente en el saco vitelino del feto y, a partir de la cuarta semana, se sintetiza también en el hígado fetal. Posteriormente, más allá de la 11.^a semana de gestación, el hígado fetal sintetiza la práctica totalidad de la AFP, debido a la degeneración del saco vitelino. En el momento del nacimiento, su concentración en suero fetal no suele sobrepasar los 150 ng/mL y alcanza el nivel normal del adulto, inferior a 10 ng/mL, alrededor del décimo mes de vida. En las mujeres gestantes, en el tercer trimestre, las concentraciones séricas de AFP alcanzan 150-250 ng/mL. Posteriormente, tras el parto, la AFP desaparece de la circulación en el plazo de 4-5 días, ya que la presente en el suero materno proviene del feto. La AFP elaborada por el feto se transfiere al líquido amniótico por la orina fetal, siendo, por ello, las concentraciones en líquido amniótico generalmente paralelas a las encontradas en el suero fetal, aunque unas 150 veces más bajas: 20 000 ng/mL frente a 3 000 000 ng/mL en la 16.^a semana de gestación, que es donde se presenta el máximo. A medida que avanza la gestación, la AFP aparece en el suero materno, debido al paso a través de la placenta o la difusión a través de las membranas fetales. Sin embargo, siendo la AFP materna de origen fetal, resulta paradójico que en el segundo trimestre la AFP en suero materno siga aumentando alrededor del 15 % por semana, hasta alcanzar su pico en la 25.^a semana, mientras que en el líquido amniótico declina un 13 % durante ese mismo período. La explicación a este hecho estriba en la gran expansión que experimenta la superficie amniótica durante este tiempo, lo que permite que se incremente la difusión de AFP desde el líquido amniótico al suero materno.

Existen varios factores que afectan las concentraciones de AFP en el suero materno, y que deben tenerse siempre presentes:

1. Edad gestacional: pueden encontrarse valores alterados cuando se subestima o sobreestima el tiempo de gestación.
2. Peso de la madre: mientras más elevado sea el peso de la madre, más baja es la concentración de AFP en el suero; es decir, hay una relación inversa entre estos parámetros, debido al incremento del volumen sanguíneo de la madre.
3. Diabetes de la madre: las mujeres diabéticas dependientes de insulina tienen concentraciones de AFP significativamente más bajas que las no diabéticas.
4. Raza: las concentraciones maternas de AFP sérica en la población negra son aproximadamente un 10 % más elevadas que las de la población no negra.
5. Número de fetos: se observan valores aumentados en las gestaciones múltiples.

3.2. Métodos de análisis de la AFP

Los principales métodos que se emplean en la actualidad para la determinación de AFP son el radioinmunoanálisis y el enzimoinmunoanálisis, que se realizan generalmente en sistemas automáticos. Los valores de AFP se expresan frecuentemente en unidades de masa (ng/mL), aunque no se dispone de ningún patrón puro de AFP en estas unidades. En consecuencia, los valores en unidades de masa obtenidos para un mismo espécimen varían en función del origen del patrón utilizando para calibrar el método. El calibrador de referencia es el 1.^{er} Estándar Internacional de la Organización Mundial de la Salud para la AFP (Código 72-225). Las relaciones estimadas de la Unidad Internacional y las unidades de masa oscilan entre 0.91 y 1.29 ng/U. Por ello, la comparación interlaboratorios debe basarse sólo en UI/mL, y

siempre debe conocerse la relación entre el patrón utilizado y las UI. Es decir, los valores obtenidos con diferentes métodos no pueden intercambiarse indistintamente.

3.3. Aplicaciones clínicas

La determinación de AFP, tanto en suero materno como en líquido amniótico, se utiliza para la detección de diferentes anomalías fetales. Las concentraciones de AFP en el suero materno se encuentran elevadas en el 85-95 % de las gestaciones con fetos con defectos del tubo neural y bajas en el 30 % de los fetos con síndrome de Down. Sin embargo, esta prueba se suele realizar junto con otras (hCG, estriol) a la hora de realizar el despistaje prenatal.

4. ESTRIOLO

En las mujeres no gestantes los ovarios son el origen principal de los estrógenos, mientras que durante la gestación la principal productora es la placenta. No obstante, la placenta no puede llevar a cabo la síntesis *de novo* de los estrógenos a partir de los precursores que utilizan los ovarios (acetato, colesterol y progesterona) y tiene que provenir de esteroides suprarrenales de origen materno o fetal. Como se observa en la Figura 33-1, tanto el feto como la placenta cooperan en la biosíntesis de estriol durante la gestación. El estriol es el estrógeno que se produce más abundantemente durante la gestación. El estriol formado se secreta hacia la circulación materna, donde se esterifica en el hígado, dando lugar a compuestos con velocidades de depuración distinta. Este hecho, así como diferencias de la secreción tubular explican la gran variabilidad interindividual de las concentraciones de estriol sérico y urinario en las gestantes. Por tanto, el suero materno contiene estriol libre, también denominado estriol no conjugado (uE3), que puede medirse para evaluar el estado de la unidad fetoplacentaria. Como se comentó en el Capítulo 32, durante un embarazo normal las concen-

traciones séricas de estriol en la madre presentan un aumento progresivo, alcanzando valores extremadamente elevados al final del período de gestación. Por tanto, las concentraciones bajas de estriol durante el embarazo o una súbita disminución de las mismas observada en determinaciones sucesivas, se asocian con sufrimiento fetal.

Las medidas de estriol libre o estriol no conjugado (uE3) pueden ser de utilidad clínica en el tratamiento de las gestantes que presenten complicaciones como diabetes mellitus, preeclampsia, hipertensión, retraso de crecimiento uterino y embarazo prolongado. Sin embargo, las concentraciones de estriol libre deben interpretarse, junto con otros datos, para la evaluación del daño fetoplacentario. Además, las concentraciones de estriol libre en suero durante el primer trimestre de gestación son relativamente bajas, por lo que no se consideran útiles para el diagnóstico. Las determinaciones de estriol libre pueden ser útiles para la evaluación de la viabilidad fetal durante el segundo y tercer trimestre de la gestación. De todas formas, un valor bajo aislado de estriol libre no es significativo, ya que las concentraciones normales presentan grandes variaciones individuales; además, existen fluctuaciones esporádicas, diurnas y cotidianas, que dificultan la interpretación de un único resultado.

Por otra parte, determinadas condiciones afectan las concentraciones maternas de estriol libre, independientemente del estado fetoplacentario. Así, las concentraciones maternas de estriol libre son bajas en cada una de las siguientes circunstancias: *a*) cuando está suprimido el ACTH fetal por corticosteroides administrados a la gestante; *b*) en fetos anencefálicos y en fetos con aplasia hipofisaria; *c*) si existe un déficit de sulfatasa placentaria o de 16-hidroxilasa; *d*) si la madre está tomando ampicilina u otro antibiótico que interfiera con la circulación enterohepática de los conjugados de estriol.

Las determinaciones sucesivas tienen un mayor significado diagnóstico para evaluar las tendencias en la producción de estriol que una determinación aislada. Una caída brusca de las concentraciones de estriol libre puede

indicar aplasia de las glándulas suprarrenales fetales, crecimiento intrauterino fetal retardado, muerte fetal, toxemia, incompatibilidad Rh o cálculo erróneo del tiempo de gestación. Si la determinación de estriol libre sérico indica una disminución de más del 40 % con respecto a los valores previos, debe considerarse la posibilidad de daño fetal y estudiar otros parámetros de viabilidad.

Por otro lado, el estriol libre también se encuentra disminuido en las gestantes portadoras de un feto con síndrome de Down, aunque su incorporación en el despistaje prenatal está en entredicho, como se comentará posteriormente.

5. DESPISTAJE PRENATAL EN EL SUERO MATERNO

Los primeros programas de despistaje prenatal en el suero materno se pusieron en marcha a finales de la década de los 70, después de que se demostrara la incidencia significativa de valores elevados de AFP, tanto en el líquido amniótico como en el suero de las gestantes portadoras de fetos con defectos del tubo neural (DTN). Por casualidad, utilizando los datos obtenidos en estos programas de despistaje de DTN, se observó en 1984 la asociación del síndrome de Down con concentraciones bajas de AFP. Más tarde, se fueron introduciendo otras magnitudes bioquímicas como la hCG o el estriol no conjugado, tomando como base la consecución de un mayor porcentaje de detección de gestantes portadoras de fetos con síndrome de Down. Actualmente, con estos programas de despistaje prenatal no sólo se detectan defectos del tubo neural o síndrome de Down, sino otras cromosopatías, como la trisomía 18.

5.1. Defectos del tubo neural (DTN)

La formación del tubo neural en el feto se completa normalmente a las 4 semanas de la concepción. Cuando el cierre del mismo no se produce quedan secuelas permanentes en la zona del cerebro o de la columna verte-

bral: anencefalia, encefalocele y meningocele, denominada comúnmente espina bífida. Su etiología es multifactorial, pues intervienen tanto factores genéticos como ambientales, y su prevalencia es de 1 por cada 1800 nacimientos. En estos casos, la zona afectada no se encuentra recubierta por la piel y entra directamente en contacto con el líquido amniótico, produciéndose un incremento de las proteínas séricas fetales en este líquido, que genera finalmente una elevación sustancial de la AFP en el suero materno, cuya determinación puede detectar hasta el 90 % de los casos.

La mayoría de los programas de despistaje de DTN recomienda la determinación de AFP en suero materno en la semana 16 de gestación, con límites entre la 14.^a y la 18.^a, y los resultados se expresan como múltiplos de la mediana (MoM). Para ello, hay que determinar previamente las medianas de las concentraciones de AFP para cada semana de gestación, entre la 14.^a y la 18.^a, utilizando al menos los resultados de 100 gestantes con fetos normales en cada una. Así, los resultados de las concentraciones de AFP en las gestantes evaluadas se dividen por la mediana, que corresponde a su edad gestacional, y se obtienen las MoM, en cada caso. Estas MoM analíticas se tienen que ajustar por el peso de la madre, dividiéndolas por el valor: $10^{(0.2472 - 0.003758 \times \text{peso de la madre en kg})}$. Las MoM ajustadas por el peso de la madre se dividen por 1.1 si la madre es de raza negra; por 0.75 si la madre es diabética dependiente de insulina y por 1.05 en el caso de tabaquismo. Estas correcciones vienen motivadas por la influencia de determinados factores sobre la concentración sérica de AFP, como puede observarse en el Cuadro 33-2. Finalmente, el riesgo de defectos del tubo neural viene establecido para valores superiores a 2,5 MoM, en cuyo caso se recomienda una amniocentesis.

5.2. Síndrome de Down

En todas las gestaciones existe un riesgo de que el feto sufra una anomalía cromosómica, siendo el síndrome de Down la más

Cuadro 33-2. Factores que influyen sobre las concentraciones séricas de AFP, β -hCG y uE3

Factor	AFP	hCG	E3
Edad gestacional	↑	↓	↑
Peso materno	↓	↓	↓
Raza negra	↑	↑	
Diabetes insulínopeda.	↓	↓	↓
Tabaquismo	↑	↓	↓
Gemelaridad	↑	↑	↑
Sexo fetal (varón)	↑		

frecuente. El riesgo global de toda la población de tener un hijo con síndrome de Down es de 1 por cada 600 nacimientos, pero este riesgo se hace mayor a medida que aumenta la edad de la madre. La mayoría de los individuos presenta trisomía del cromosoma 21 causada por un fallo en la separación cromosómica durante la meiosis, aunque un 4 % de los casos observados es el resultado de una translocación de un fragmento del cromosoma 21 a otro cromosoma, frecuentemente el cromosoma 14.

El diagnóstico prenatal de una posible alteración cromosómica en el feto se realiza mediante el estudio del cariotipo de las células fetales, obtenidas, en general, mediante amniocentesis. Sin embargo, esta técnica invasiva no está exenta de riesgo y, en consecuencia, sólo se aplica cuando los criterios de coste-riesgo/beneficio son aceptables, que el consenso general suele situar a partir de los 35 años de edad. A pesar de todo, aproximadamente el 70 % de los niños con síndrome de Down nace de madres menores de 35 años (Fig. 33-3), por lo que se están haciendo muchos esfuerzos para encontrar técnicas de despistaje en suero materno que permitan seleccionar madres jóvenes.

La introducción de los marcadores bioquímicos para las alteraciones cromosómicas ha representado un cambio radical en el concepto de detección de estas anomalías congénitas, desplazando la idea de estudiar una población de riesgo por la mucho más amplia y socialmente aceptable del despistaje sistemá-

tico a todas las gestantes, hasta el punto de que existen propuestas de retrasar la indicación de «técnica invasiva por edad materna» a los 38 años.

Los marcadores bioquímicos de las alteraciones cromosómicas nacieron de la observación, publicada por Merkatz en el año 1984, de la asociación de concentraciones bajas de AFP a una aneuploidía. A partir de ese momento, se han introducido, y combinado entre sí, diversos marcadores como la hCG (intacta, β -hCG total o β -hCG libre), el estriol no conjugado (uE3), la SP-1 (*Schwangerschaftsprotein-1*), la fosfatasa alcalina placentaria, NAP (fosfatasa alcalina neutrófila resistente a urea) y la PAPP-A (proteína plasmática asociada a la gestación-A). La justificación del uso de todos estos marcadores se encuentra en que los fetos con síndrome de Down y sus placentas tienen un retraso en su desarrollo, respecto a los fetos normales de su misma edad gestacional. Este retraso del desarrollo se asocia con alteraciones en el suero materno de las concentraciones de una gran cantidad de parámetros bioquímicos.

Aunque existen múltiples marcadores bioquímicos, los más utilizados son la AFP, la hCG (intacta, β -hCG total, —fracción β total— o β -hCG libre) y el estriol no conjugado (uE3). Respecto a este último existe controversia sobre su utilización, ya que no hay unanimidad acerca de si su asociación a la AFP y la hCG aumenta la capacidad de detección o, por lo contrario, incrementa los falsos positivos.

Tanto la AFP como la hCG, intacta o fracción β total, son marcadores del segundo trimestre de gestación, por lo que su determinación debe realizarse después de la semana 14.^a El momento ideal para su cuantificación se sitúa entre la 14.^a y la 18.^a semanas de gestación. Si bien la fracción libre de la hCG puede utilizarse en el primer trimestre (semana 13.^a) junto a la AFP, los valores de esta última, en ese momento de la gestación, no sirven para el despistaje de los defectos del tubo neural.

El índice de riesgo de síndrome de Down se establece mediante el cálculo tanto del riesgo previo en función de la edad de la ma-

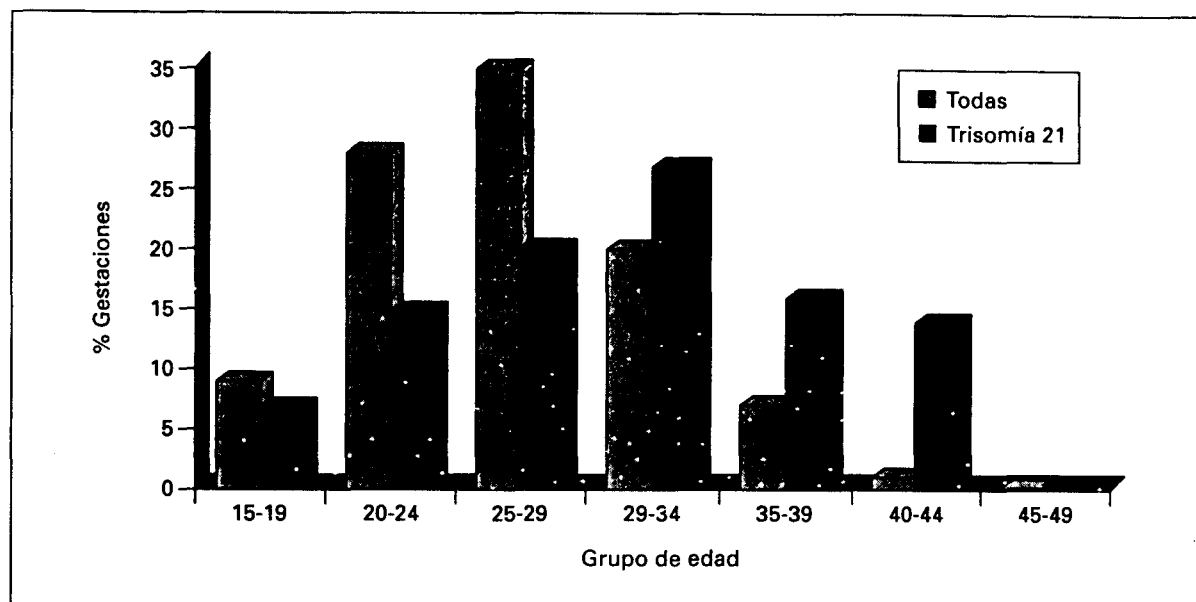


Figura 33-3. Distribución de las frecuencias porcentuales de embarazos según la edad materna, en todas las mujeres gestantes y sólo en aquellas con hijos afectados de síndrome de Down.

dre como de las MoM de la AFP y de la hCG obtenidas en cada caso. El riesgo previo de presentar un feto con síndrome de Down, entre la 15.^a y 20.^a semanas de gestación, para la edad de la madre en la fecha probable del parto, viene dado por la fórmula: $1:(1-p)/p$, siendo $p = 0.000627 + e^{(-162395 + 0.286 \times (\text{edad} - 0.458))}$. Las MoM ajustadas de la AFP se calculan como se expuso anteriormente en los defectos del tubo neural. De la misma manera, para el caso de la hCG hay que determinar previamente las medianas de las concentraciones de la hCG para cada semana de gestación, entre la 14.^a y la 18.^a, utilizando al menos los resultados de 100 gestantes con fetos normales en cada una. Así, los resultados de las concentraciones de hCG en las gestantes evaluadas se dividen por la mediana, que corresponde a su edad gestacional, y se obtienen las MoM, en cada caso. Estas MoM analíticas se tienen que ajustar por el peso de la madre, dividiéndolas por el valor: $10^{(0.2139 - 0.003251 \times \text{peso de la madre en kg})}$. Las MoM ajustadas por el peso de la madre se dividen por 1,1 si la madre es de raza negra, por 0.91 si la madre es diabética dependiente de insulina y por 0.89 en el caso de tabaquismo. Estas correcciones vienen motivadas por la

influencia de ciertos factores sobre la concentración sérica de la hCG, como puede observarse en el Cuadro 33-2. Los valores individuales superiores a 2.5 MoM de la hCG y menores de 0.5 MoM de la AFP, serán indicativos de aumento del riesgo. Pero el definitivo índice de riesgo de síndrome de Down se obtiene mediante un algoritmo que calcula el riesgo combinado (cociente de verosimilitud) en la fecha probable del parto o en el momento de la determinación analítica, para la edad de la paciente y las MoM de las magnitudes bioquímicas. Estos algoritmos, en aplicaciones informáticas, para el cálculo de riesgo de la trisomía 21 utilizan un conjunto de variables obtenidas a partir del análisis estadístico de una población, con y sin síndrome de Down. Este cálculo da como resultado una probabilidad que indica el riesgo teórico de que la gestante sea portadora de un feto con síndrome de Down. Si el cálculo del riesgo es superior a 1/270, equivalente al de una gestante de 35 años de edad en el momento de la determinación analítica, se recomienda la realización de una amniocentesis. Cumpliendo todos estos requisitos, se suele obtener una detección del 60-70 % con una tasa de falsos positivos del 5-6 % en gestantes de

menos de 35 años y del 8-10 % si se incluyen todas las gestantes.

Debe quedar bien claro que con las pruebas bioquímicas en suero materno no se realiza ningún diagnóstico de alteración cromosómica, sino que solamente se obtiene un índice de riesgo de que el feto tenga cromosomopatía. Por tanto, la decisión posterior, una vez conocido el índice de riesgo, debe consistir en la realización de un cariotipo, que es la prueba verdaderamente diagnóstica. Es decir, el objetivo perseguido es corregir el riesgo de «grupo» que ofrece el factor edad materna por un riesgo individualizado en cada caso.

BIBLIOGRAFÍA

- ALBRECHT, E. D., y PEPE, G. J.: «Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy». *Endocr Rev*, 11: 124-149, 1990.
- BIRKEN, S., et al.: «The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG): II: Characteristics and origins of nicks in hCG reference standards». *Endocrinology*, 129: 1551-1558, 1991.
- BOCK, J. L.: «Current issues in maternal serum alpha-fetoprotein screening». *Am J Clin Pathol*, 97: 541-554, 1992.
- CANNICK, J. A., et al.: «Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancies with Down's syndrome». *Br J Obstet Gynecol*, 95: 330-333, 1988.
- CHARD, T.: «Pregnancy tests: A review». *Hum Reprod*, 7: 701-710, 1992.
- COLE, L. A., y KARDANA, A.: «Discordant results in human chorionic gonadotropin assays». *Clin Chem*, 38: 263-270, 1992.
- DAR, H., et al.: «Maternal serum marker levels in consecutive pregnancies: a possible genetic predisposition to abnormal levels». *Am J Med Gen*, 61: 154-157, 1996.
- KARDANA, A., y COLE, L. A.: «Polypeptide nicks cause erroneous results in assays of human chorionic gonadotropin free β -subunit». *Clin Chem*, 38: 26-33, 1992.
- KHALIL, A., et al.: «Inhibin in normal and abnormal pregnancy: maternal serum concentration and partial characterization». *Am J Obstet Gynecol*, 172: 1019-1025, 1995.
- MCLEAN, M., et al.: «A placental clock controlling the length of human pregnancy». *Nature Med*, 1: 460-463, 1995.
- MERKATZ, et al.: «An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities». *Am J Obstet Gynecol*, 148: 886-894, 1984.
- REYNOLDS, T., y PENNEY, M. D.: «The mathematical basis of multivariate risk screening: with special reference to screening for Down's syndrome risk factors». *Clin Chem*, 38: 1888-1893, 1992.
- REYNOLDS, T. M.: «Practical problems in Down's syndrome screening: what should we do about gestation dating? What is the effect of assay precision on risk factors?» *Commun Lab Med*, 2: 31-38, 1992.
- SILER-KHODR, T. M.: «Endocrine and paracrine function of the human placenta». En: *Fetal and neonatal physiology*. Polin, R. A., Fox, W. W. (eds). Saunders, Filadelfia, 1992.
- SZABÓ, M., et al.: «Maternal age-dependent and sex-related changes of gestational serum alpha-fetoprotein». *Fetal Diagn Ther*, 10: 368-372, 1995.
- THOMAS, C. M. G., et al.: «Human choriogonadotropin(hCG): comparisons between determinations of intact hCG, free hCG β -subunit, and "total" hCG + β in serum during the first half of high-risk pregnancy». *Clin Chem*, 36: 651-655, 1990.
- WALD, N., et al.: «Prenatal biochemical screening for Down's syndrome and neural tube defects». *Curr Opinion in Obstet and Gynecol*, 81: 447-450, 1992.
- WALD, N. J., et al.: «Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy». *Br Med J*, 297: 883-887, 1988.
- WALD, N. J., et al.: «Maternal serum screening for Down's syndrome: the effect of routine ultrasound scan determination of gestational age and adjustment for material weight». *Br J Obstet Gynecol*, 99: 144-149, 1992.