

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**Evolución de los criterios de selección de gestantes en
riesgo de cromosomopatía fetal. Papel de la edad materna**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mará José Gómez Rodríguez

Directores

**Alberto Galindo Izquierdo
Juan José González Aguilera**

Madrid, 2017

© Mará José Gómez Rodríguez, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**EVOLUCIÓN DE LOS CRITERIOS DE SELECCIÓN DE
GESTANTES EN RIESGO DE CROMOSOMOPATÍA FETAL.
PAPEL DE LA EDAD MATERNA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

María José Gómez Rodríguez

Directores

Dr. Alberto Galindo Izquierdo

Dr. Juan José González Aguilera

Madrid, 2015



El Dr. Alberto Galindo Izquierdo, Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y Jefe de la Sección de Medicina Fetal del Hospital Universitario 12 de Octubre.

CERTIFICA:

Que ha codirigido el trabajo "**Evolución de los criterios de selección de gestantes en riesgo de cromosomopatía fetal. Papel de la edad materna**", que será presentado por Dña. María José Gómez Rodríguez para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

En Madrid, a diecisiete de octubre de dos mil quince.

Una firma manuscrita en tinta que parece leerse 'A. Galindo Izquierdo'.

Fdo. Prof. Dr. Alberto Galindo Izquierdo
Profesor Titular de Obstetricia y Ginecología



El Dr. Juan José González Aguilera, Catedrático de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICA:

Que ha codirigido el trabajo **"Evolución de los criterios de selección de gestantes en riesgo de cromosomopatía fetal. Papel de la edad materna"**, que será presentado por Dña. María José Gómez Rodríguez para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

En Madrid, a dieciocho de octubre de dos mil quince.

Fdo. Dr. Juan José González Aguilera
Catedrático de Genética UAM

A mis padres

A Jesús

A mis hijos

AGRADECIMIENTOS

En el momento de escribir estas líneas, son muchos los recuerdos de aquellas personas, experiencias, buenos y malos momentos, vivencias y situaciones que, desde que comencé mi andadura en el mundo de la Genética Humana (hace más de 25 años) me vienen a la cabeza. Todas estas situaciones han condicionado lo que hoy soy, mi visión de esta disciplina y mi cariño hacia ella.

Va a ser difícil reflejar en unas simples líneas de texto mi gratitud a todas las personas que han participado en el desarrollo de este trabajo:

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis padres, allá donde estén, que en ningún momento, con mucho esfuerzo y amor, dudaron en poner a mi alcance todo lo necesario para que consiguiese desarrollar mis objetivos profesionales. Nunca os lo agradeceré suficiente.

Mi agradecimiento a la Dra. Emilia Barreiro Miranda por aceptarme como asistente voluntario en el Servicio de Genética del Hospital Universitario 12 de Octubre, allá por el año 1986 y permitirme hacer de su laboratorio mi segunda casa.

Al Dr. José Ignacio Olaizola Llodio, al que tengo que agradecer mis primeros conocimientos del mundo de la Ecografía Fetal, sé que me habría prestado su ayuda en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Alberto Galindo Izquierdo, por haberme ayudado a poner en marcha este proyecto, por haber confiado en mí para a llevarlo a cabo, por haberme dedicado su tiempo y haberme enseñado tantísimas cosas.

Al Dr. Juan José González Aguilera, mi profesor, mi amigo. Me enseñaste a amar la Citogenética, con esas clases fantásticas y unas prácticas maravillosas con recursos muy limitados. Gracias por tu calidad humana, por estar siempre disponible para resolver mis dudas, enseñarme nuevas metodologías citogenéticas y mantener una relación que se inició hace más de 30 años. Al final conseguiste que hiciera la tesis.

Al Departamento de Epidemiología Clínica del Hospital Universitario 12 de Octubre, en especial a David Lora, que me ha orientado en la realización del estudio estadístico y análisis de datos.

No quiero olvidarme del apoyo, ayuda y confianza que me ha brindado M^a Dolores Blanco Gaitán, mi tutora de tesis.

Qué decir de mis amigos y compañeros del laboratorio de Genética, gracias a todos. Es complicado resumir en pocas líneas la convivencia durante tantos años con muchos de vosotros. A Ana Moreno por compartir tantas horas, días y años en este mundo agradecido, y a veces difícil, que es el Diagnóstico Prenatal Citogenético. A Marisa Martín, gracias por tu amistad, por tu constante ánimo para que no decayera mi actitud ante este reto, por tu paciencia y saber escuchar. Manoli Fernández, menos tiempo compartido pero tan intenso como el que más, verás como todo se consigue con perseverancia e ilusión. No quiero

olvidarme de Javier Fernández y Marta Moreno, compañeros también desde hace mucho tiempo.

Quiero reconocer el trabajo que realizan los Técnicos del Laboratorio, por su dedicación, esmero e implicación en las tareas cotidianas. Especialmente a M^a José González, por su ayuda en el desarrollo de esta tesis y por ser una enamorada de su trabajo y a Isabel Padilla, tantas aventuras y desventuras en vuestra compañía. A Paloma, Miguel, Noelia, Beatriz Ángela, Anais y Bea también muchas gracias por vuestro apoyo; y a mi querida Paquita Flechoso, me hubiera gustado que siguieras estando con nosotros y compartir contigo este trabajo. A Mar, nuestra secretaria, por tu implicación en este proyecto desde su comienzo, sin poner inconvenientes ante mis exigencias.

A Jesús, mi marido, por apoyarme y acompañarme durante tantos años, por compartir buenos y malos momentos, por ayudarme, aconsejarme, por permitirme crecer y aprender a tu lado. Te admiro profundamente.

A mis hijos Ignacio y Guillermo, paradojas de la vida, con los que he coincidido en esta nueva etapa universitaria. Gracias por ser tan buena gente, por vuestro estímulo y por entender mi aislamiento en los últimos meses para poder terminar este trabajo. Que el esfuerzo y la ilusión nunca os falle.

A mi hermano, incondicional durante toda mi vida.

Gracias a todos por estar siempre a mi lado.

M^a José Gómez Rodríguez

INDICE	Página
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
SUMMARY	6
1.- INTRODUCCIÓN	8
1.1 El diagnóstico prenatal	8
1.2 Técnicas prenatales invasivas para realizar diagnóstico prenatal	9
1.2.1 Amniocentesis	9
1.2.2 Biopsia corial	11
1.2.3 Cordocentesis	12
1.3 Las herramientas para realizar diagnóstico citogenético	12
1.3.1 Técnicas de bandeado cromosómico	13
1.3.2 Hibridación in situ fluorescente (FISH)	14
1.3.2.1 Sondas específicas de locus	14
1.3.2.2 Sondas centroméricas	15
1.3.2.3 Sondas subteloméricas	16
1.3.2.4 Sondas de pintado cromosómico	16
1.3.2.5 Sondas Acro-p	17
1.3.3 QF-PCR para diagnóstico rápido de aneuploidías	18
1.3.4 Array-CGH	19
1.3.5 ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature)	20
1.4 Cromosomopatías	21
1.4.1 Anomalías numéricas	22
1.4.1.1 Triploidías y tetraploidías	22
1.4.1.2 Aneuploidías	22
1.4.1.2.1 Trisomías	23
1.4.1.2.2 Monosomías	23
1.4.2 Reordenamientos Cromosómicos Estructurales (RCEs)	23
1.4.2.1 Translocaciones recíprocas	25
1.4.2.2 Translocaciones Robertsonianas (ROBs)	26
1.4.2.3 Inversiones	27
1.4.2.4 Deleciones	29
1.4.2.5 Duplicaciones	30
1.4.2.6 Isocromosomas	32
1.4.2.7 Cromosomas en anillo	32
1.4.2.8 Cromosomas marcadores supernumerarios (sSMC)	33

1.4.2.9 Heteromorfismos y Polimorfismos	34
1.5 Indicaciones para realizar diagnóstico prenatal invasivo	35
1.5.1 Parejas portadoras de reordenamiento cromosómico (PPR)	36
1.5.2 Gestantes con historia de abortos (HA)	36
1.5.3 Hijo anterior con cromosopatía de novo (HCN)	37
1.5.4 Ansiedad materna (AM)	38
1.5.5 Edad materna avanzada (EMA)	38
1.5.6 Marcadores bioquímicos en suero materno	40
1.5.6.1 Marcadores bioquímicos del segundo trimestre	40
1.5.6.2 Marcadores bioquímicos del primer trimestre	40
1.5.7 Cribado combinado del primer trimestre (CC1)	41
1.6 Marcadores ecográficos	42
1.6.1 Translucencia nucal (TN)	43
2.- OBJETIVOS	47
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	48
3.1- Recogida de las muestras	50
3.1.1 Líquido amniótico	50
3.1.2 Sangre periférica	50
3.2 Técnicas de cultivo celular	51
3.2.1 Cultivo de sangre periférica	51
3.2.1.1 Cultivo estándar	51
3.2.1.2 Cultivo de alta resolución	52
3.2.2 Cultivo de líquido amniótico	53
3.3 Bando cromosómico	54
3.3.1 Bandas G	54
3.3.2 Bandas C	55
3.3.3 Tinción Ag-NOR	55
3.4 Análisis al microscopio	55
3.5 Hibridación in situ fluorescente	55
3.5.1 Preparación de extensiones para análisis de núcleos en interfase	56
3.5.2 Hibridación con sondas de secuencia única (LSI)	56
3.5.3 Hibridación con sondas centroméricas y/o alfoides	57
3.5.4 Hibridación con sondas painting	58
3.5.5 Hibridación con sondas Acro-p	58
3.6 PCR cuantitativa fluorescente (QF-PCR)	58
3.6.1 Extracción de ADN	58
3.6.2 Mezclas de reacción y amplificación	59

3.6.3	Análisis de los fragmentos e interpretación de los resultados	62
3.7	Arrays-CGH	64
3.8	Análisis estadístico	64
4.-	RESULTADOS	65
4.1-	Características de la población de estudio	65
4.2-	Tasa de amniocentesis/año	65
4.3-	Tasa indicación para amniocentesis/año	66
4.4-	Tasa de amniocentesis por indicación	67
4.5-	Resultados citogenéticos	69
4.5.1-	Alteraciones numéricas	70
4.5.2-	Reordenamientos cromosómicos estructurales (RCEs)	73
4.6-	Descripción de las alteraciones cromosómicas detectadas en función del criterio de referencia y Valor predictivo positivo (VPP)	76
4.6.1-	Pareja portadora de reordenamiento cromosómico (PPR)	77
4.6.2-	Marcador y/o malformación ecográfica (ME)	78
4.6.3-	Cribado combinado de 1º trimestre (CC1)	79
4.6.4-	Edad materna avanzada (EMA)	80
4.6.5-	Ansiedad materna (edad <35 años)	83
4.6.6-	Hijo anterior con cromosomopatía de novo (HAC)	83
4.6.7-	Malformación congénita previa (MCP)	84
4.6.8-	Screening bioquímico en suero materno (SBQ)	84
4.6.9-	Gestante con historia de abortos (HA)	85
4.7-	Capacidad diagnóstica de las indicaciones durante los quinquenios de análisis.	85
4.7.1-	Alteraciones numéricas	85
4.7.2-	Reordenamientos cromosómicos estructurales (RCEs)	87
4.8-	Análisis multivariante entre las diferentes indicaciones	88
5.-	DISCUSIÓN	89
5.1	Indicaciones clínicas	89
5.2	Capacidad de detección para cromosomopatías	92
5.2.1-	Aneuploidías	92
5.2.2-	Reordenamientos cromosómicos estructurales (RCEs)	94
5.2.2.1-	Reordenamientos equilibrados	95
5.2.2.1.1	Translocaciones recíprocas	96
5.2.2.1.2	Translocaciones Robertsonianas (ROBs)	97
5.2.2.1.3	Inversiones	98
5.2.2.2-	Reordenamientos desequilibrados	99
5.2.2.2.1	Derivados de translocación desequilibrados	99

5.2.2.2.2 Deleciones	100
5.2.2.2.3 Duplicaciones	101
5.2.2.2.4 Cromosomas marcadores supernumerarios (sSMC)	101
5.2.2.2.5 Cromosomas en anillo e Isocromosomas	102
5.3 Valor predictivo positivo de las diferentes indicaciones amniocentesis	103
6.- CONCLUSIONES	108
7.- BIBLIOGRAFÍA	110

ABREVIATURAS

ADN Ácido desoxiribonucleico

AFP Alfaproteína

Ag-NOR Tinción con nitrato de plata para la identificación de regiones organizadoras nucleolares.

AM Ansiedad materna

Array-CGH Hibridación genómica comparada sobre una matriz.

ARSA Arteria subclavia derecha aberrante

BE Bromuro de etidio

CC1 Cribado combinado del primer trimestre

CEP Chromosome Enumeration Probe.

CNVs Copy Number Variations

CRL Longitud craneocaudal

Cy3 Cyanina 3-verde

Cy5 Cyanina 5-rojo

CGH Hibridación genómica comparada

DPC Diagnóstico Prenatal Citogenético

EMA Edad materna avanzada

EQA European Quality Assurance

FEI Foco ecogénico intracardiaco

FISH Hibridación in situ fluorescente.

FoSTeS Parada de la horquilla de replicación y cambio de molde

HA Gestante con historia de abortos

HCN Hijo anterior con cromosomopatía de novo

IC Intervalo de confianza

ICE Efecto Inter-cromosómico

Inv-dup Inversiones-duplicaciones

ISCN International System for Human Cytogenetic Nomenclature

IVE interrupción voluntaria de embarazo.

IVE Interrupción voluntaria del embarazo

Kb Kilobase

LA Líquido amniótico

LSI Locus Specific Identifier.

Mb Megabase

MCP Hijo anterior con malformación congénita

ME Marcadores ecográficos

μl Microlitro

MMBIR Replicación de roturas debidas a microhomología

MMEJ Unión de extremos por recombinación microhomóloga

ml Mililitro

MoM Múltiplos de la mediana

NAHR Recombinación homóloga no alélica

NHEJ Unión de extremos por recombinación no homóloga

NOR Regiones organizadoras nucleolares

OMS Organización Mundial de la Salud.

PAPP-A Proteína plasmática asociada al embarazo

Pb Pares de bases.

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PHA Fitohemaglutinina

PPR Parejas portadoras de reordenamiento cromosómico

QF-PCR Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa fluorescente

RCEs Reordenamientos cromosómicos estructurales

ROBs Translocaciones Robertsonianas

rpm revoluciones por minuto

SBQ *Screening* bioquímico en suero materno del 2º trimestre

SEGO Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia

sg segundos

sSMC Cromosomas marcadores supernumerarios.

STRs Short Tandem Repeats

TN Translucencia nucal

uE3 Estriol no conjugado

VOUS Variants of uncertain clinical significance

WCP Whole Chromosome Painting.

β -hCG Fracción libre de la hormono coriónica gestacional

RESUMEN

El asesoramiento genético, en asociación con los procedimientos de diagnóstico prenatal, constituye un elemento básico para la identificación de anomalías congénitas y trastornos genéticos, facilitando a la pareja una adecuada información, mediante Consejo Genético, que les permita tomar decisiones informadas respecto a la gestación. El estudio citogenético fetal se conoce como una metodología fiable y resolutive en circunstancias de riesgo para cromosomopatía. El método invasivo, utilizado de manera universal para la obtención de una muestra fetal, es la amniocentesis. Desde la implementación de esta disciplina, a mediados de los años 80, los criterios para la selección de gestantes en riesgo de alteración cromosómica fetal han sufrido múltiples variaciones, siempre encaminadas a optimizar el coste-beneficio de la prueba invasiva, y a obtener la máxima sensibilidad. Las metodologías utilizadas para realizar estudios citogenéticos prenatales se han ido perfeccionando mediante la inclusión de nuevas técnicas que permiten caracterizar las anomalías cromosómicas con mayor exactitud y ofrecer un Consejo Genético correcto. Dentro de los criterios de selección de embarazadas en riesgo de cromosomopatía, la edad materna avanzada (≥ 35 años) ha sido la indicación con mayor prevalencia para realizar estos análisis a pesar de presentar una baja sensibilidad. Actualmente, la edad de la madre está incluida en el método de Cribado combinado de 1^{er} trimestre para trisomía 21 y trisomía 18, lo que ha hecho disminuir considerablemente las amniocentesis por edad materna avanzada como criterio aislado.

En este trabajo nos hemos planteado describir la evolución y tendencias en los criterios establecidos para la selección de gestantes en riesgo de cromosomopatía fetal durante un periodo de 25 años, analizando la incidencia de las diferentes categorías de alteraciones cromosómicas en cada uno de los criterios para realizar amniocentesis, para establecer el Valor Predictivo Positivo para la detección de cromosomopatías de las distintas indicaciones incluidas en los protocolos de Diagnóstico Prenatal. Además, hemos valorado las frecuencias de Alteraciones numéricas y Reordenamientos cromosómicos estructurales en gestantes remitidas por Edad materna avanzada (≥ 40). Todo ello nos ha permitido establecer que la optimización de los criterios de selección de gestantes ha reducido de manera significativa el número de procedimientos invasivos. En este sentido, la introducción del Cribado combinado del primer trimestre resulta ser una herramienta eficaz para la detección de síndrome de Down, aunque la incorporación al algoritmo utilizado de marcadores ecográficos adicionales, además de la translucencia nugal, mejoraría sustancialmente la estimación del riesgo. Es necesario realizar un Consejo genético posterior a la detección de un resultado de riesgo en el cribado combinado de 1^{er} trimestre, para informar de los posible hallazgos citogenéticos tras la amniocentesis, los cuales, en caso de ser diferentes a los incluidos en el test integrado, pueden implicar un manejo gestacional diferente al esperado y una elevada ansiedad en la pareja. Las

indicaciones de estudio citogenético con mayor rendimiento diagnóstico son Pareja portadora de reordenamiento estructural y Marcador y/o malformación ecográfica. Estos, sin duda, constituyen la herramienta más eficiente para la identificación de gestantes con riesgo de cromosopatía fetal en ausencia de factores de riesgo preconcepcionales. La Edad materna menor de 40 años, como criterio para realizar un procedimiento invasivo, se debe eliminar en los protocolos prenatales, siempre que el grupo de trabajo disponga de métodos de cribado integrado y/o ecográficos. Se debe realizar amniocentesis genética en gestantes con edad igual o superior a 40 años, dado que la incidencia de patologías no incluidas en el test de cribado presentan tasas superiores al riesgo estimado de pérdida fetal asociado a la prueba invasiva. La identificación de una alteración cromosómica requiere una interpretación individualizada de las posibles consecuencias clínicas, utilizando la metodología obstétrica y citogenética a nuestro alcance, que nos permita transmitir una información clara y objetiva a las parejas para tomar la decisión más adecuada respecto al embarazo.

SUMMARY

The genetic counselling, together with prenatal diagnosis procedures, constitutes a basic element for the identification of genetic abnormalities and pathologies, thus facilitating adequate information to the parents, through genetic advice, in order to make appropriate decisions regarding gestation. The fetal cytogenetic study is recognized as a suitable, reliable and operative methodology for chromosomopathy risk assessment. The invasive method used in a generalized manner to obtain fetal samples is the amniocentesis. Since the implementation of this approach during mid 80s, the criteria to select those pregnancies under chromosomal alteration risk have underwent multiple variations, always towards the optimization of the cost-benefit of this invasive test and to provide the highest sensitivity. Accordingly, the methodologies used for prenatal cytogenetic have been improved in order to obtain a better characterization of chromosomal abnormalities to support an accurate Genetic Counseling. Among the selection criteria for chromosomopathy risk, the advanced maternal age (≥ 35 years) has been the highest prevalent indication for these analyses, in spite of a low sensitivity. At present, the maternal age is included into the first trimester combined screening procedure for the chromosome 21 and 18 trisomies, allowing to a significant reduction of the amniocentesis numbers due only to maternal age.

In this work, we aimed to describe the evolution and tendencies on the established criteria to select pregnancies at risk of fetal chromosomopathy during a period of 25 years. To this we have analyzed the incidence of the different chromosomal alteration categories to perform amniocentesis, in order to establish the positive predictive value for the chromosomopathy detection of the different indications included into the current prenatal diagnosis protocols. In addition, we have evaluated the numeric alteration and chromosomal rearrangement frequencies in advanced maternal age pregnancies. Collectively, all these analyses has allowed us to establish that the optimization of the selection criteria has led to a significant reduction of the invasive procedure numbers. In this regard, the implementation of the first trimester combined screening has provided a reliable tool for the detection of Down syndrome, although the implementation into this algorithm with other echographic markers, besides the nuchal translucency, will significant improve the risk assessment. It is necessary to carry on Genetic Counseling after a positive result on the first trimester combined screening, to inform of the possible cytogenetic findings, which may imply a different gestation management respect to that expected with the concurrent increase in anxiety for the couple, in case that these results were different to those incorporated into the integral test. The cytogenetic study indications showing the highest diagnostic performance are: Couple carrying structural rearrangements and Marker and/or echographic malformation. These undoubtedly represent the most efficient tools for the identification of pregnancies at risk of fetal chromosomopathies in the absence of other

preconception risk factors. The maternal age below 40 yrs, as a possible criterion for the invasive procedure, should be removed from the current prenatal protocols if integrated or echographic screening procedures are available. According to our results, the amniocentesis should be carried in pregnancies corresponding to maternal age of 40 years or above, since the incidence of pathologies non included in the screening is higher than the risk of miscarriage associated to this invasive procedure. The identification of a chromosomal alteration requires a personalized assessment of the possible clinical outcomes, using the obstetric and cytogenetic methodologies, to provide a clear and objective information to the patient couples in order to make the most adequate decision regarding the pregnancy.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El diagnóstico prenatal

El Diagnóstico Prenatal (DP) supone un conjunto de actuaciones y metodologías encaminadas a conocer la adecuada formación y el correcto desarrollo del feto durante la gestación. Además de la detección de anomalías fetales y en su caso la posibilidad de interrupción voluntaria de embarazo (IVE), actualmente contemplada en nuestro país en la Ley Orgánica 2/2010, de 3 de marzo, de salud sexual y reproductiva, el diagnóstico prenatal incluye la realización de un Consejo Genético previo a la gestación para asegurar decisiones basadas en una información completa así como un Consejo Genético posterior a la prueba invasiva en aquellos casos con fetos afectados. Las pruebas genéticas con finalidad clínica, reguladas por la ley 14/2007 de Investigación Biomédica, deben solicitarse dentro del ámbito sanitario como parte de un proceso diagnóstico o predictivo, han de tener un claro beneficio para el paciente y en ningún caso deben suponer un perjuicio. El diagnóstico prenatal está sujeto a fuertes implicaciones sociales, éticas y legales, por ello se debe realizar sin coacción y con el apoyo suficiente para permitir a la pareja tomar las decisiones más adecuadas de acuerdo a sus valores.

La precocidad en el diagnóstico de una anomalía congénita fetal conlleva la posibilidad de anticipar la interrupción de la gestación, lo cual supone una menor repercusión psicológica y una disminución de la morbilidad materna (*Zolese et al., 1992; McFadyen et al., 1998*). Aunque la mayoría de las gestaciones no muestran patología fetal, la confirmación de normalidad contribuye a reducir la ansiedad durante el resto del embarazo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define defecto congénito como “toda anomalía del desarrollo morfológico, estructural, funcional o molecular presente al nacer, externa o interna, familiar o esporádica, hereditaria o no y única o múltiple”. Las anomalías congénitas son la primera causa de mortalidad y de morbilidad infantil en las sociedades desarrolladas con una prevalencia aproximada del 2-3% de los recién nacidos vivos (*Ling et al., 1991*) presentan algún tipo de defecto congénito, cifra que se duplica a los 7-8 años de edad con aquellas enfermedades genéticas de aparición tardía y/o que se han retrasado en su diagnóstico (*Myriantopoulos et al., 1985*).

Las causas que originan las malformaciones congénitas se pueden dividir en cuatro grandes grupos:

- Enfermedades hereditarias mendelianas o monogénicas: Son las responsables del 25% de los defectos congénitos y están presentes en el 1-1,5% de los nacidos. Los mecanismos de transmisión responden a su carácter recesivo, dominante autosómico o ligado a los cromosomas sexuales. El riesgo de recurrencia oscila entre el 25-50%.
- Enfermedades multifactoriales: Estas patologías son el resultado de factores genéticos y ambientales. Son las que presentan mayor frecuencia poblacional aunque el riesgo de

recurrencia es muy inferior al de las enfermedades monogénicas. Aproximadamente la mitad de las malformaciones congénitas son debidas a estos factores y suponen un gran reto en el ámbito del diagnóstico prenatal.

- Malformaciones por efecto ambiental teratogénico: en las que intervienen diferentes causas (fármacos, infecciones, radiaciones ionizantes y tóxicos ambientales). Se estima que son el origen del 10% de los defectos congénitos.
- Anomalías cromosómicas: Ocurren aproximadamente en 15% de las anomalías congénitas severas diagnosticadas antes del año de nacimiento, siendo las responsables del 25% de las muertes perinatales debidas a anomalías congénitas. (*Zeitlin et al., 2009*).

La integración de todas las actuaciones necesarias para el diagnóstico de anomalías congénitas es altamente compleja, por lo que su realización se organiza en torno a un programa multidisciplinar en el que la Genética desempeña un papel esencial para la identificación de estas anomalías. La combinación del avance de los métodos de cultivos celulares y técnicas de análisis citogenético posibilitaron el reconocimiento del estudio cromosómico prenatal como un método seguro y fiable para la detección de cromosomopatías (*Caron et al., 1999*). El diagnóstico prenatal citogenético se lleva a cabo mediante técnicas invasivas que proporcionan la muestra para su estudio, técnicas estrechamente ligadas al desarrollo de la ecografía obstétrica (*Donald and Brown, 1961*) que posibilitan el estudio anatómico del feto y la realización de estos procesos. La ecografía bidimensional permite en la actualidad el diagnóstico de más del 80% de los defectos congénitos que cursen con anomalías morfológicas, además del seguimiento del embarazo. Como describiremos posteriormente, estas metodologías llevan implícito un riesgo de complicaciones en el embarazo, dentro del cual se incluye el aborto involuntario.

Estudios poblacionales han reportado que entre 5%-10 % de las gestantes se someten a una prueba invasiva para la detección de cromosomopatías. (*Nicolaides et al., 2005, 2005a; Eddleman et al., 2006*).

1.2 Técnicas invasivas para realizar diagnóstico prenatal

1.2.1 Amniocentesis

La amniocentesis como técnica para el diagnóstico citogenético se reportó a finales de los años 60 como un procedimiento invasivo de segundo trimestre reservado para las gestantes con riesgo de cromosomopatía (*Steele y Berg, 1966; Jacobson and Barter, 1967*). Inicialmente se realizó sin guía ultrasonográfica, lo que conllevaba un riesgo aproximado de pérdida del embarazo del 14% (*Bantock et al., 1979*). En el momento actual es la metodología más ampliamente utilizada para la obtención de muestras fetales con el objetivo de realizar estudios citogenéticos prenatales (*Newberger et al., 2000*).

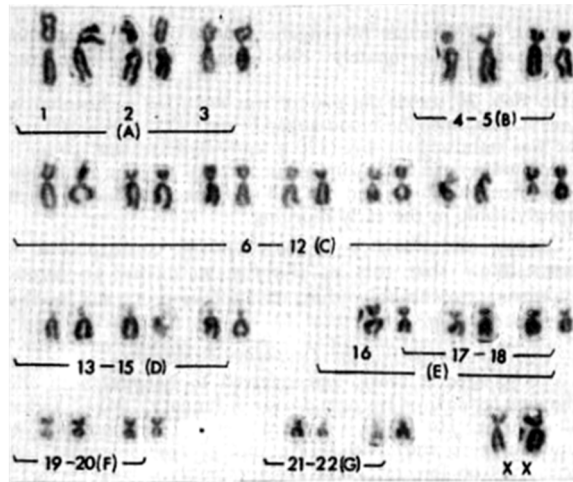


Figura 1. Primer cariotipo fetal obtenido a partir de líquido amniótico (Steele and Breg, 1966).

Respecto a la capacidad diagnóstica de esta prueba, diversos estudios multicéntricos han reflejado la eficacia de esta metodología estableciendo una tasa de éxito superior al 99% (Jackson et al., 2012).

La técnica consiste en la introducción de una aguja espinal a través de la pared abdominal, pared uterina y cavidad amniótica bajo guía ecográfica continua, de forma que se pueda aspirar una muestra del líquido amniótico.

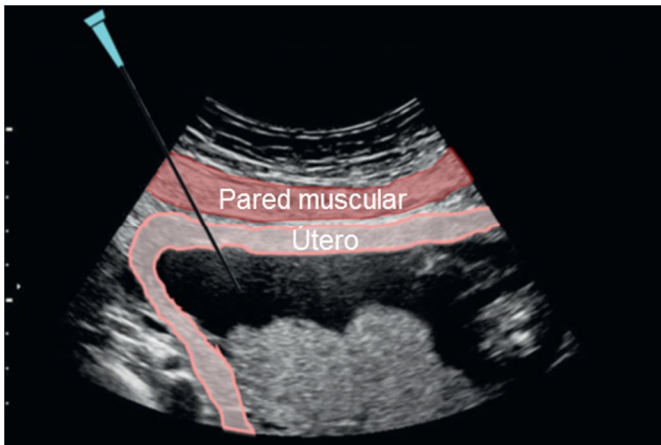


Figura 2. Punción de la pared abdominal materna hasta llegar al útero. Muestra la manera correcta de actuación, con visualización completa de todo el trayecto de la aguja (Parra-Saavedra et al., 2014).

El éxito de la prueba se basa en el establecimiento de cultivos celulares para la obtención de células en división que puedan ser analizadas al microscopio óptico en el estadio de metafase. Las células fetales contenidas en el líquido amniótico tienen capacidad de adhesión al sustrato de cultivo y pueden ser clasificadas en tres grupos principales en base a su morfología, bioquímica y características de crecimiento: epitelioides (tipo E), líquido amniótico (tipo AF) y células fibroblásticas (tipo F). Las células de tipo E se ha postulado que derivan de la piel y la orina, las células de tipo AF fetales de membranas ovulares y trofoblasto y las

células de tipo F de tejido fibroso y fibroblastos dérmicos conectivos (Hoehn et al., 1982; Prusa et al., 2002; Bossolasco et al., 2006; Perin et al., 2008).

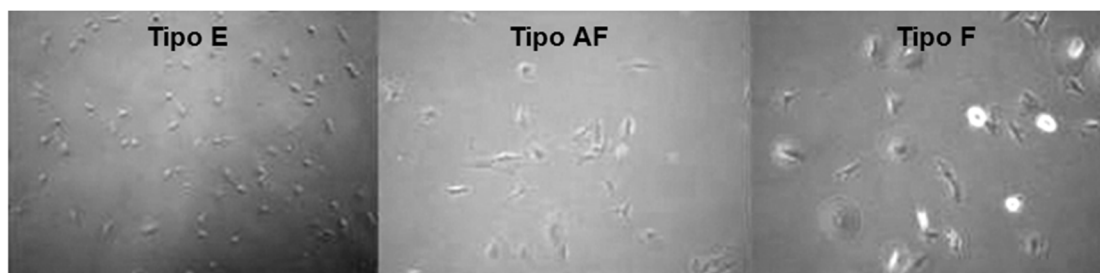


Figura 3. Morfología de las células contenidas en un cultivo de líquido amniótico obtenido en la 15ª semanas de gestación (Perin et al., 2008).

En el momento actual se recomienda realizar la amniocentesis a partir de la 15ª semana gestacional, una vez se ha producido la fusión completa de la membrana amniótica con el corion; la amniocentesis precoz (11ª-14ª semana gestacional) se utilizó durante un largo periodo de tiempo, aunque actualmente se ha desechado por su asociación con una mayor tasa de pérdida fetal y anomalías musculo-esqueléticas, así como complicaciones respiratorias en el recién nacido (Johnson et al. *Canadian Early and Mid-trimester amniocentesis trial Group*, 1998; Celderholm et al., 2005).

1.2.2 Biopsia corial

La realización de biopsias coriales se inició a finales de la década de los años 60, mediante la utilización de histeroscopia, con alto riesgo para la gestante y resultados de laboratorio adversos (Hehnemann et al., 1968). Posteriormente se incorporó la guía ecográfica para la toma de muestra por vía transcervical (Kazy et al., 1982) o vía transabdominal (Smidt-Jensen & Hahnemann, 1984), acción que mejoraba del 65 a 96 % el índice de obtención de muestras adecuadas. Brambati et al., 1983 establecieron la metodología para la preparación directa de las vellosidades coriales, aprovechando las mitosis espontáneas de las células del citotrofoblasto y su rápida proliferación sin necesidad de cultivo tisular. Respecto a la validez del resultado obtenido a partir de la biopsia corial, se establece en un 99% de los casos, especialmente para el diagnóstico de las aneuploidías más frecuentes (Ledbetter et al., 1990; Wapner et al., 2005).

Estos métodos para la obtención de muestra fetal conllevan un riesgo de aborto involuntario, aunque existen discrepancias respecto a la estimación de estos riesgos. Mujezinovic et al., 2007 describen una frecuencia entre 0,6-0,9% para amniocentesis aunque estudios más recientes reflejan que el riesgo de pérdida fetal involuntaria anterior a la 24ª semana gestacional se aproximaría al 0,1% (Akolekar et al., 2015). El *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG)*, describió en 2011 un riesgo de aborto involuntario

asociado a la biopsia corial del 1-2% (*Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, 2011*). Los criterios para establecer la idoneidad del operador se encuentran reflejados en las directrices elaboradas en este documento, considerando fundamental la experiencia del operador junto con el número de técnicas realizadas por año así como el grupo de trabajo y las técnicas empleadas para su realización.

Los criterios referidos anteriormente respecto a las características y consideraciones tanto de la biopsia corial como de la amniocentesis son aceptados y compartidos por la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO), como se refleja en el trabajo realizado por el Grupo colaborativo de la SEGO en 2013 (*Carreras et al., Grupo colaborativo de la SEGO., 2013*).

1.2.3 Cordocentesis

En 1982, *Daffos et al.* publicaron la primera experiencia en la obtención de sangre fetal del cordón umbilical con el uso de una aguja por vía percutánea guiada por ultrasonografía. Esta metodología se denomina Cordocentesis o Funiculocentesis y puede ser realizada a partir del 2º trimestre de gestación, permitiendo obtener el cariotipo fetal tras un cultivo celular de 72 horas. Se considera la técnica invasiva más difícil y complicada de realizar, con un riesgo estimado de pérdida fetal del 3% (*Tongsong et al., 2000*). Se utiliza exclusivamente para confirmación de mosaicismos en líquido amniótico o detección de cromosopatías en gestaciones avanzadas.

De manera general se recomienda la realización de los procedimientos invasivos de forma centralizada. Un estudio multicéntrico realizado por *Tabor et al., 2009* establece que la tasa de aborto asociada a la prueba invasiva es inversamente proporcional a la experiencia del centro que la realice.

1.3 Las herramientas para realizar diagnóstico citogenético

La era moderna de la Citogenética Humana da comienzo en 1956 con el descubrimiento del número de cromosomas presentes en las células humanas (*Tjio y Levan., 1956*). En los años posteriores se correlacionaron diferentes fenotipos con alteraciones cromosómicas específicas (Síndrome de Down, *Lejeune et al., 1959*; Síndrome de Turner, *Ford et al., 1959*; Síndrome de Klinefelter, *Jacobs et al., 1959*; Síndrome de Edwards, *Edwards et al., 1960*; Síndrome de Patau, *Patau et al., 1960*). El perfeccionamiento de las técnicas citogenéticas y la implementación de nuevas metodologías durante las dos décadas posteriores contribuyeron notablemente al desarrollo de esta disciplina.

1.3.1 Técnicas de bandeado cromosómico

Inicialmente los estudios cromosómicos se realizaron utilizando técnicas de tinción sencillas que solo permitían la clasificación de los cromosomas según su tamaño y morfología. La visualización de un patrón de bandas características en el cromosoma metafásico constituyó el siguiente objetivo en el desarrollo de la citogenética. La primera aproximación fue realizada por *Casperson et al., 1969* obteniendo bandas transversales fluorescentes (Bandas Q) y bandas

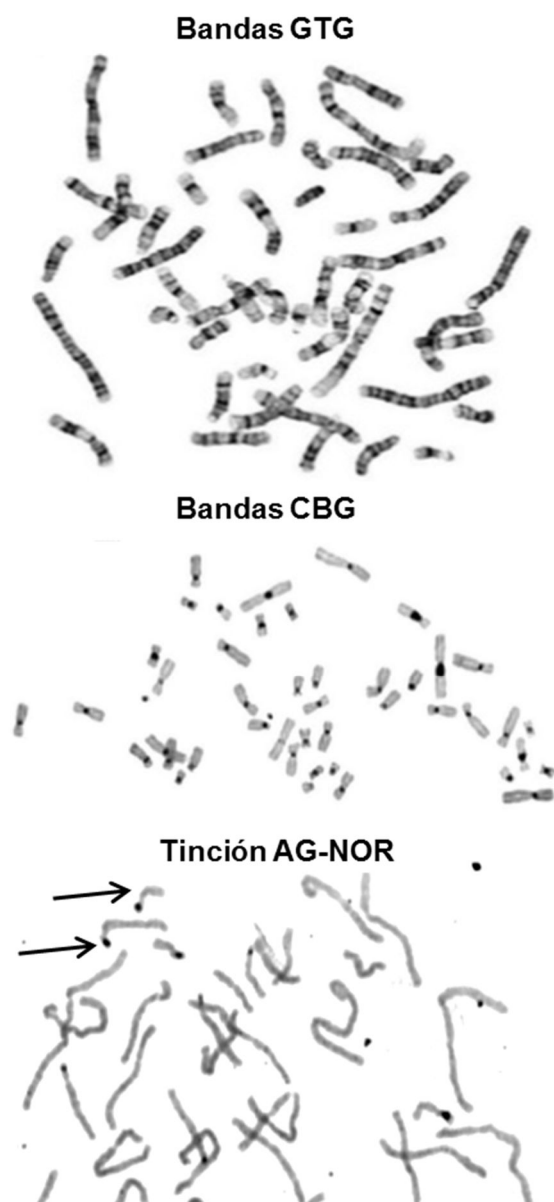


Figura 4. Metafases con diferentes tinciones cromosómicas.

oscuras. El bandeado C supuso un gran avance al permitir la identificación de las regiones centroméricas en los cromosomas (regiones de ADN altamente repetitivo localizado preferencialmente en las zonas pericentroméricas, teloméricas de los cromosomas acrocéntricos y región distal del brazo largo del cromosoma Y (*Arrighi et al., 1971* y *1971a*)). Pero la estrategia que permitió el reconocimiento de los cromosomas, de manera independiente y directamente al microscopio óptico sin equipamiento fluorescente, fue la implementación de las bandas G (*Seabright et al., 1971*). Utilizando un cultivo estándar se obtiene un patrón de 400 bandas para cada genoma haploide (permite detectar deleciones o duplicaciones de un tamaño superior a 5-10 Mb) y en torno a 850 bandas en el caso de un cultivo de alta resolución (capacidad de detección de 3-5 Mb). Se estima que un 80% de los genes se localizan en las bandas claras (las más ricas en nucleótidos G+C), que a su vez son las que presentan menor condensación. También se ha observado que, en general, las bandas claras son de replicación temprana.

Los genes que están en regiones más condensadas (bandas oscuras) son de replicación más tardía. Parece, por tanto, que regiones con alta densidad de genes, ricas en C+G y descondensadas se replican antes que regiones silenciadas o con baja densidad de genes. La implementación de la técnica Ag-NOR también

ha constituido una herramienta muy útil para discriminar polimorfismos localizados en los cromosomas acrocéntricos de cromosopatías verdaderas. Esta tinción marca las regiones organizadoras nucleolares situadas en los brazos p de los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22. (Matsui and Sasaki, 1973).

1.3.2 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

En la década de 1980 comenzó el desarrollo de la citogenética molecular con la introducción de la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), que permite la localización morfológica de secuencias genéticas en núcleos interfásicos o en metafase. Las primeras aproximaciones realizadas para identificar morfológicamente secuencias genéticas se llevaron a cabo por Pardue y Gall, 1969; John et al., 1969, utilizando isótopos radioactivos como marcaje para los ácidos nucleicos. El desarrollo de marcadores fluorescentes junto con la síntesis de oligonucleótidos *in vitro* han sido los avances más importantes en la evolución de esta metodología (Landegent et al., 1984; Coghlan et al., 1985). La primera aplicación de la FISH en cromosomas humanos se dirigió hacia la identificación de estas estructuras en células híbridas (humanas–ratón) (Pinkel et al., 1986).

La resolución de esta técnica es muy superior a la del cariotipo, permitiendo identificar reordenamientos cromosómicos complejos o reorganizaciones de pequeño tamaño, por lo que la FISH resulta una herramienta robusta para la detección de síndromes conocidos, translocaciones crípticas descritas en procesos hemato-oncológicos, mosaicismos en núcleos en interfase y aneuploidías en estudios prenatales (Kalousek et al., 1996, 1996a).

Esta metodología utiliza sondas de oligonucleótidos (fragmentos de ADN homólogos a la secuencia diana) marcadas con una molécula fluorescente y con una longitud mínima de 50Kb, que reconocen secuencias específicas de ADN en el cromosoma. El procedimiento está basado en el mecanismo de complementariedad de los ácidos nucleicos y su aplicación se tiene que realizar de forma dirigida en base a una sospecha clínica determinada.

Existen diferentes tipos de sondas de oligonucleótidos para la realización de esta técnica en función de las regiones que son capaces de detectar, agrupándose en cuatro categorías:

1.3.2.1 Sondas específicas de locus

Estas sondas, denominadas también LSI (*Locus Specific Identifier*), hibridan con una secuencia única de ADN. Requieren conocer *a priori* la región que se desea analizar y permiten detectar reordenamientos estructurales de genes o de regiones cromosómicas concretas e identificar deleciones y duplicaciones submicroscópicas con un tamaño mínimo de 3Mb. (Kasprzak et al., 1998).

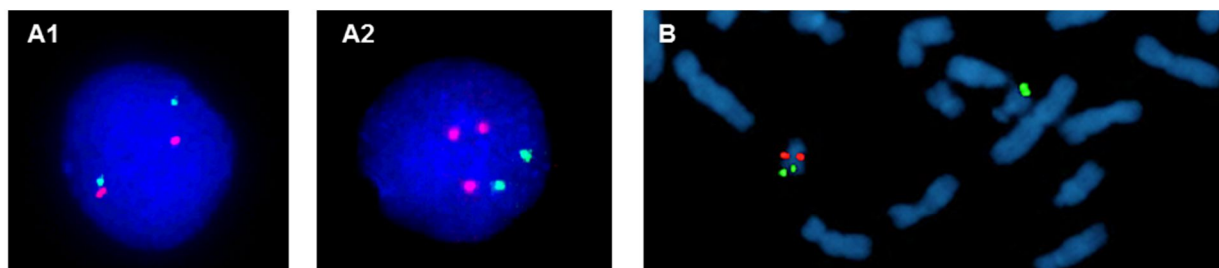


Figura 5. A) Núcleos en interfase de amniocitos con FISH sonda LSI 21 (21q22.q22.2) SpectrumOrange y LS13 (13q14) SpectrumGreen. A1) Dos señales para el cromosoma 21 y dos señales para el cromosoma 13; A2) Tres señales para el cromosoma 21 y dos señales para el cromosoma 13. B) Metafase parcial con FISH sonda Tuple 1 SpectrumOrange/ARSA SpectrumGreen donde se observa delección de la región 22q11.2 (SpectrumOrange).

1.3.2.2 Sondas centroméricas

Las regiones centroméricas de los cromosomas presentan secuencias prácticamente idénticas, diferenciándose únicamente en el 2-3% de su composición. Las regiones diana de estas sondas se encuentran precisamente en esta región, permitiendo identificar de manera individual la mayor parte de los centrómeros, a excepción de los cromosomas 13-21 y 14-22. Estas sondas facilitan la detección de alteraciones de tipo numérico, especialmente trisomías y monosomías en metafase y núcleos interfásicos. También se denominan sondas CEP (*Chromosome Enumeration Probe*).

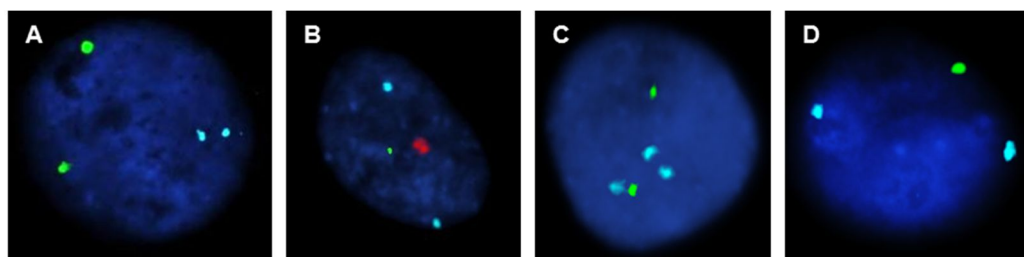


Figura 6. A) Amniocito en interfase con FISH sonda LPE0XY (SpectrumGreen/Spectrum Orange) y sonda CEP 18 SpectrumAcqua. Se observan dos señales fluorescentes para el cromosoma X y dos señales para el cromosoma 18. B) Núcleo de amniocito en interfase con FISH sonda LPE0XY (SpectrumGreen/Spectrum Orange) y sonda CEP 18 SpectrumAcqua. Se observa señal fluorescente verde para cromosoma X y roja para cromosoma Y, además de dos señales para cromosoma 18. C) Núcleo de amniocito en interfase con FISH sonda LPE0XY (SpectrumGreen/Spectrum Orange) y sonda CEP 18 SpectrumAcqua., donde se observan tres señales para el cromosoma 18. D) Núcleo de amniocito en interfase con FISH sonda LPE0XY (SpectrumGreen/Spectrum Orange) y sonda CEP 18 SpectrumAcqua. Se puede observar monosomía para el par sexual.

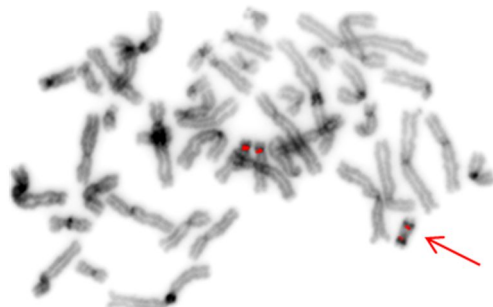


Figura 7. Metafase con FISH sonda CEP 14 Spectrum Orange donde se identifica un cromosoma marcador derivado del cromosomas 14.

1.3.2.3 Sondas subteloméricas

Identifican regiones cromosómicas próximas a los telómeros, las cuales contienen secuencias únicas que son específicas de cada cromosoma. Fueron definidas por *Riethman et al., 2005* como las últimas 500Kb distales de cada brazo cromosómico eucariota y poseen una elevada resolución (30-100Kb), constituyendo una herramienta muy útil, dado que estos segmentos cromosómicos son altamente ricos en genes y presentan reordenamientos con consecuencias clínicas relevantes, como sucede en el 10% de los retrasos mentales idiopáticos (*Durmaz et al., 2013*).

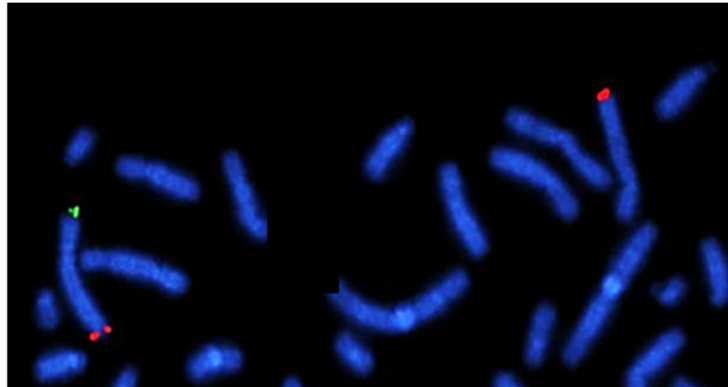


Figura 8. Metafase parcial con FISH sondas tel 4p (Spectrum Green)/4q (Spectrum Orange), donde se puede observar una deleción telomérica en el brazo p de uno de los cromosomas del par 4.

1.3.2.4 Sondas de pintado cromosómico

Se trata de sondas complejas generadas a partir de microdissección cromosómica, las cuales se amplifican y marcan con fluorocromos que hibridan con múltiples secuencias del cromosoma, a excepción de los centrómeros y telómeros.

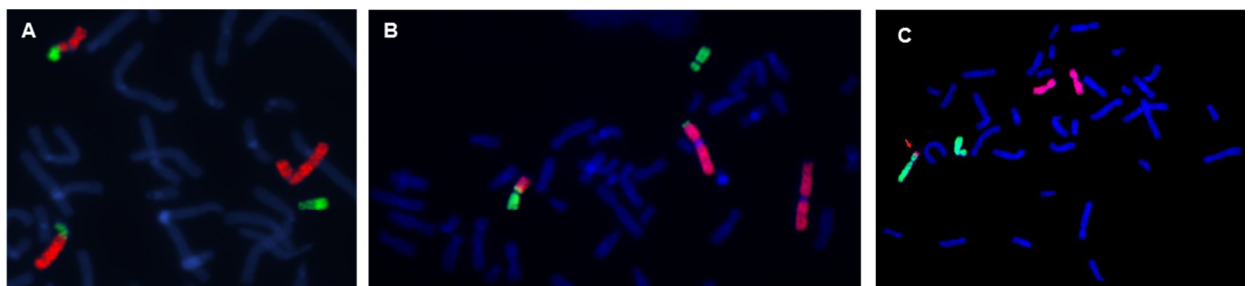


Figura 9. **A)** Metafase parcial con FISH sonda WCP 10 (Spectrum Orange) y sonda WCP 21 (Spectrum Green) donde se observa una translocación recíproca. **B)** Metafase parcial con FISH sonda WCP 1 (Spectrum Orange) y sonda WCP 17 (Spectrum Green) donde se observa una translocación recíproca. **C)** Metafase parcial con sonda WCP 11 (Spectrum Orange) y sonda WCP 8 (Spectrum Green) donde se observa una deleción del cromosoma 8 y una trisomía parcial del cromosoma 11.

También se denominan *WCP (Whole Chromosome Painting)* y se utilizan principalmente para detectar translocaciones difíciles de identificar por citogenética convencional, así como material adicional presente en cromosomas derivativos o pequeños cromosomas supernumerarios. Su

uso es específico de metafases y no permiten detectar inversiones paracentroméricas y reordenamientos con resolución menor de 2-3Mb.

1.3.2.5 Sondas Acro-p

Las regiones organizadoras nucleolares (NOR) contienen complejos génicos codificantes para las moléculas de ARNr de mayor estructura (18 S y 28 S). Estos genes ribosomales poseen una importancia crítica para la viabilidad de la célula y representan aproximadamente el 0,5% del genoma diploide humano. Se encuentran en el brazo corto de los cromosomas acrocéntricos y constituyen la región alrededor de la cual se desarrollan los nucléolos al final de la mitosis. Una región NOR se puede transferir a una región terminal de otro cromosoma, aunque este suceso rara vez es patológico, salvo cuando la translocación ha dado lugar a una delección en la región terminal del cromosoma receptor.

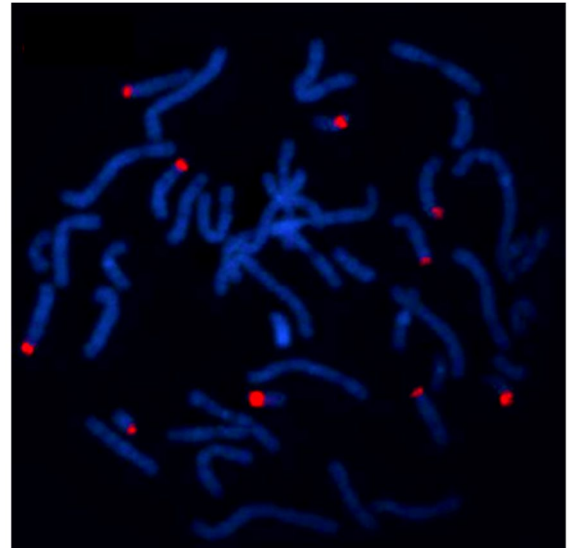


Figura 10. Metafase con FISH sonda Acro-p (*SpectrumOrange*). Se observan las regiones NOR en los 10 cromosomas acrocéntricos.

Se ha sugerido que la reestructuración de los genes del ARNr es la alteración cromosómica más frecuente en los tumores sólidos de adultos. La sonda Acro-p es complementaria a las regiones de ADN codificante para ARN ribosómico, lo cual permite identificar todos los NOR presentes en la metafase y ha sustituido a la tinción Ag-NOR en la práctica citogenética.

A partir de los distintos tipos de sondas, se pueden realizar diferentes combinaciones en función de la patología que se requiera identificar:

- Existen paneles para diagnóstico citogenético en células en interfase utilizadas comúnmente para detectar aberraciones numéricas de los cromosomas 13, 18, 21, X e Y, los cuales se aplican fundamentalmente en muestras prenatales para el diagnóstico rápido de aneuploidías (*Zahed et al., 1992*).
- El diagnóstico de Síndromes de Microdelección es otro ejemplo de estas posibles combinaciones. Estas sondas son utilizadas frecuentemente tanto en estudios prenatales como postnatales, permitiendo la identificación de regiones cromosómicas submicroscópicas (*Novelli et al., 1999; Chen et al., 2013; Sharma et al., 2015*). Hasta el momento se han descrito más de 200 tipos de Síndromes de Microdelección, muchos de los cuales pueden ser detectados con esta metodología. Las microdeleciones sindrómicas que presentan mayor prevalencia en la población son: Síndrome del

maullido de gato (*Cri-du-chat*), Síndrome de Miller-Dieker, Síndrome DiGeorge/Velo-Cardio-Facial/CATCH 22, Síndrome de Wolf-Hirschhorn, Síndrome de Prader-Willi/Angelman y Síndrome de Smith-Magenis.

1.3.3 QF-PCR para diagnóstico rápido de aneuploidías

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa fluorescente (QF-PCR- *Quantitative Fluorescent PCR*) fue desarrollada a finales de los años 90 como una metodología molecular rápida y eficiente para la detección directa del número de copias de los cromosomas implicados en las aneuploidías más comunes, a partir de ADN extraído de células de líquido amniótico (*Pertl et al., 1994; Adinolfi et al., 1997.*

Consiste en la detección de secuencias de ADN genómico utilizando oligonucleótidos (secuencia lineal de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster, habitualmente con tamaño <50 nucleótidos) marcados con moléculas fluorescentes. Los productos de PCR pueden ser entonces identificados y cuantificados utilizando el área y altura de un pico generado por un programa de análisis de fragmentos en secuenciadores automáticos de ADNA. Las secuencias utilizadas se denominan microsatélites (STRs- *Short Tandem Repeats*). Estas regiones están presentes en todo el genoma y son estables y polimórficas, es decir, varían en longitud entre individuos dependiendo del número de veces que contengan un determinado motivo de repetición (tri-, tetra-, penta-nucleótido), pero manteniéndose invariables a lo largo de la vida del individuos y de una generación a otra. Si el marcador STR es altamente polimórfico, pocos individuos normales deberán ser homocigotos y por tanto mostrar un pico; los individuos heterocigotos normales mostrarán dos picos (patrón heterocigoto) mientras que los individuos trisómicos podrán mostrar tanto un patrón dialélico (dos picos con proporción 2:1 entre sus áreas) como trialélico (tres picos con proporción 1:1:1).

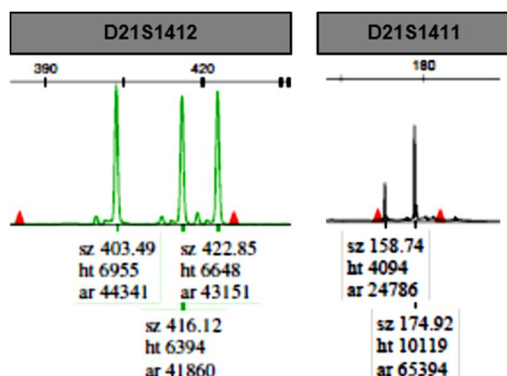


Figura 11. Patrones de amplificación patológicos en QF-PCR para dos marcadores microsatélites correspondientes al cromosoma 21. **A)** Patrón trialélico (marcador D21S1412). **B)** Patrón dialélico (marcador D21S1411). Se detalla para cada pico el tamaño en pb, área y altura en unidades arbitrarias de fluorescencia.

Para valorar el número de copias de un determinado cromosoma se utilizan un mínimo de 4 microsatélites para cada cromosoma a estudiar (*Vogliano et al., 2002*). Esta metodología es ampliamente utilizada en Diagnóstico Prenatal Citogenético para la identificación de aneuploidías totales de los cromosomas X, Y, 13, 18 y 21, además de permitir la detección de

contaminación por células maternas y el estado de cigosidad en embarazos gemelares. La QF-PCR también nos posibilita establecer el origen materno o paterno de estas aneuploidías, sin embargo, no permite detectar mosaicos por debajo del 15% (*Pertl et al., 1999; Cirigliano et al., 2001; Brun et al., 2004*).

1.3.4 Array-CGH

Esta tecnología está dirigida a la detección de las variaciones del número de copias de ADN que no pueden ser identificadas por FISH. Las primeras descripciones referentes a CGH sobre matrices fueron reportadas por *Solinas-Toldo et al., 1997*, basándose en la metodología de la Hibridación Genómica Comparada descrita por *Kallioniemi et al.* en 1992. La denominación Array-CGH fue introducida por *Pinkel et al., 1998*, donde el ADN de referencia (marcado con Cyanina 5-rojo) y el ADN del individuo a estudiar (marcado con Cyanina 3-verde) son hibridados sobre un soporte (matriz o array) que contiene fragmentos inmovilizados de ADN genómico localizados en posiciones conocidas del genoma (tamaño 100-200 Kb) (*Snijders et al., 2001; Veltman et al., 2003*). Los ADNs compiten para hibridar sobre las sondas incluidas en el array. La cuantificación de la intensidad de la fluorescencia emitida por Cy3 y Cy5 se realiza mediante un software adaptado que normaliza los datos mediante algoritmos de regresión lineal y los sitúa en el mapa genómico del organismo correspondiente. Si la intensidad de cada punto es igual se interpreta como normal, si existe un aumento de fluorescencia Cy3 se considera duplicación y si el aumento corresponde a Cy5 se interpreta como delección. Esta técnica permite el rastreo de desequilibrios globales presentes en el genoma en una única hibridación y sin necesidad de obtener células en división, además de no requerir ningún conocimiento a priori de la región genómica implicada (*Pinkel et al., 1998; Lee et al., 2007*). En contraposición, no permite detectar reordenamientos balanceados, mutaciones puntuales y mosaicismos de bajo grado por debajo del 10% (*Ballif et al., 2006; Stankiewicz et al., 2007*).

La resolución del array está limitada únicamente por la distancia entre los clones inmovilizados en la matriz y por la longitud de los mismos. Los array de baja resolución contienen alrededor de 3.000 marcadores distanciados entre sí aproximadamente 1 Mb a lo largo del cromosoma; las matrices de alta resolución alcanzan hasta 10^6 secuencias de ADN pudiendo detectar desequilibrios $< 1\text{Mb.}$; en este caso pueden surgir inconvenientes como la interpretación de la variación en el número de copias (CNVs-*Copy Number Variations*), por lo que no son utilizados en análisis prenatales. Las CNVs se definen como un segmento de ADN con un tamaño igual o superior a una Kb cuyo número de copias es variable entre diferentes individuos, clasificándose en tres grupos: causales (asociadas a patología), benignas (no asociadas a patología y presentes en la población sana) y variantes de significado incierto (no está determinado su repercusión clínica) denominadas VOUS (Variants of Uncertain Clinical Significance) (*Beaudet et al., 2010*). Existen diferentes tipos de arrays, pero los que

desempeñan un papel más determinante en el diagnóstico prenatal son los Arrays de dosis (a-CGH).

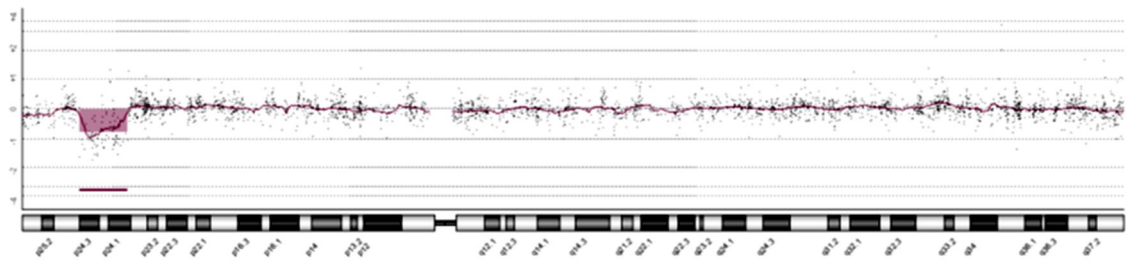


Figura 12. Array-CGH con plataforma de 44000 sondas y resolución de 200Kb donde se observa una delección en la banda 2p24.

Esta técnica puede ofertarse como prueba conjunta al cariotipo en aquellos casos con hallazgos anatómo-morfológicos anormales y cariotipo convencional normal, así como en los casos de muerte fetal con anomalías congénitas e incapacidad para obtener un cariotipo convencional, siempre en concierto con un adecuado asesoramiento genético (*American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013*), mejorando la detección de desequilibrios hasta el 8,2-15,4% (*LeCaignec et al., 2005; Valduga et al., 2010*). Otros autores informan de un aumento del 3,6% sobre el cariotipo convencional cuando se aplica independientemente de la indicación para realizar la prueba invasiva, sin detectar un incremento apreciable en la detección de variables de significado incierto (*Hillman et al., 2011*) y alcanzando el 7% si se detectan anomalías ecográficas una vez excluidas las aberraciones convencionales visibles con técnicas citogenéticas clásicas.

En España se ha establecido un Documento de Consenso para el Uso Clínico de Array-CGH a través de un grupo de trabajo promovido por el Instituto Roche. Su recomendación en el ámbito prenatal no establece en el momento actual si esta técnica va a tener un uso generalizado o no, ni cuándo se puede incorporar a la rutina prenatal, aconsejando que su utilización se realice posteriormente a una evaluación fetal mediante ultrasonidos y cribado bioquímico, junto a un asesoramiento genético previo para que la pareja entienda completamente el alcance del estudio.

1.3.5 ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*)

La terminología básica para la nomenclatura citogenética se estableció en 1971, una vez estandarizado el bandeo cromosómico para el reconocimiento específico de cada cromosoma. Este Sistema de Nomenclatura se creó a partir de la necesidad de categorizar los casos normales y anormales y de lograr una comunicación común entre los profesionales relacionados con la Genética Humana. El ISCN también ha contribuido a diseñar los ideogramas característicos de cada cromosoma con diferentes niveles de resolución. Este

manual se revisa periódicamente siendo su última actualización en 2013 (*Simons et al., 2013*).

1.4 Cromosomopatías

Las enfermedades de base cromosómica se caracterizan habitualmente por la presencia de un cuadro polimalformativo que puede ser compatible con la vida y/o provocar discapacidad física e intelectual, siendo un importante componente de la morbimortalidad perinatal e infantil así como en edad adulta. Las alteraciones cromosómicas comprenden variaciones numéricas, estructurales o combinadas en los cromosomas, pudiendo afectar tanto a los autosomas como a los cromosomas sexuales.

Los organismos eucarióticos superiores poseen generalmente dos juegos cromosómicos procedentes del padre y de la madre ($2n$). Se denomina euploidía al número de cromosomas múltiplo exacto del número haploide (n). Cuando la dotación cromosómica en el núcleo celular es un múltiplo inexacto de este número, la patología se denomina aneuploidía. Sin embargo existen gestaciones poliploides, los cuales presentan más de dos juegos cromosómicos completos (triploidías y tetraploidías).

Cuando la anomalía cromosómica presente en un individuo se debe a un error en meiosis (línea germinal), todas sus células presentan la alteración (cromosomopatía “en línea única”) mientras que si la anomalía es debida a un error mitótico postconcepcional (línea somática) el individuo presenta poblaciones celulares normales y poblaciones desequilibradas, denominándose en este caso “anomalía en mosaico”.

Se estima que el 20% de los embriones son portadores de una cromosomopatía. Estudios citogenéticos en abortos espontáneos del primer trimestre han mostrado que aproximadamente el 50% están asociados a alteraciones cromosómicas, mientras que en el segundo trimestre se identifican en el 20% de las pérdidas fetales (*Morales et al., 2008*), con un origen *de novo* en la mayoría de los casos (*Goddijn et al., 2004*). En el ámbito de la infertilidad, la prevalencia de cromosomopatías en parejas con dificultades de reproducción se estima en 2,1% para mujeres y 6,1% para varones, siendo los varones azoospermicos los que presentan mayor tasa de alteraciones cromosómicas (16%) (*Gekas et al., 2001*).

En Europa se describe una tasa de alteraciones cromosómicas al nacimiento de 43,8 por cada 1000 individuos (*Wallesley et al., 2012*) y la frecuencia de estos sucesos en individuos con retraso en el desarrollo intelectual y discapacidad se estima en 1% (*Ravnan et al., 2006; Ballif et al., 2007; Shao et al., 2008*).

Respecto a los estudios prenatales, la frecuencia de anomalías cromosómicas diagnosticadas en líquido amniótico se encuentra entre 0,27%-4,86% (*Méndez-Rosado et al., 2014; Chang et al., 2012; Tseng et al., 2006; Mademont-Soler et al., 2011; Karaouguz et al., 2006; Han et al., 2008; Comas et al., 2014; Ocak et al., 2014; Danisman et al., 2013; Ekin et al., 2014; Balkan et al., 2011*). Como hemos citado anteriormente, los rangos de anomalías

cromosómicas en diferentes estadios del desarrollo están ampliamente documentados, sin embargo los datos en el ámbito del diagnóstico prenatal, principalmente los referidos a reordenamientos cromosómicos estructurales son todavía escasos, lo que condiciona la realización del Consejo Genético.

Estos datos permiten concluir que las anomalías cromosómicas son una causa importante de muerte perinatal y discapacidad en la infancia, por lo que permanentemente se trata de buscar métodos que permitan la selección de gestantes de alto riesgo para estos trastornos.

1.4.1 Anomalías numéricas

1.4.1.1 Triploidías y tetraploidías

Las triploidías ($3n$) son diagnosticadas fundamentalmente en gestaciones, de las cuales dos tercios terminan en aborto espontáneo antes de la 15ª semana gestacional (*Hook et al., 1984*). Entre el 1-3% de las fecundaciones muestran esta alteración (*Thompson and Thompson, 2008*), siendo las responsables del 16% de los abortos espontáneos de causa cromosómica. Su origen se produce en la mayoría de los casos por la fecundación con dos espermatozoides (dispermia) aunque existen algunos casos originados por fallos en una de las divisiones meióticas durante la gametogénesis, dando lugar a óvulos o espermatozoides diploides. La expresión fenotípica de un cariotipo triploide depende del origen del complemento cromosómico extra, así, si el origen es paterno se producen anomalías placentarias denominadas molas hidatidiformes parciales mientras que un origen materno da lugar a abortos precoces.

Las tetraploidías ($4n$) producen embriones inviables y se originan por un error mitótico en la división del embrión tras la fecundación (con resultado $92, XXXX$ o $92, XXYY$) o por la fecundación de un óvulo por tres espermatozoides ($92, XXXX, 92, XXXY, 92, XXYY$ o $92, XYYY$), siendo las responsables del 6% de los abortos espontáneos de causa cromosómica.

1.4.1.2 Aneuploidías

Consisten en ganancia (trisomía) o pérdida (monosomía) de uno o más cromosomas, dando lugar en la célula a una dotación cromosómica no múltiplo del número haploide (n). Son el tipo de anomalía cromosómica constitucional más frecuente en nacidos vivos (0,14%) y se postula que el 19% de los ovocitos y el 4% de los espermatozoides son aneuploides, por lo que 1 de cada 13 concepciones tendría alteraciones cromosómicas con implicaciones clínicas (*Plachot M., 1991*).

Las trisomías junto con las monosomías constituyen la mayor causa de muerte perinatal y discapacidad en la infancia; consecuentemente, la detección de estas cromosomopatías supone la indicación más frecuente para realizar Diagnóstico prenatal citogenético.

1.4.1.2.1 Trisomías

La mayoría de las trisomías autosómicas son letales y dan lugar a abortos espontáneos en el primer trimestre de gestación. Únicamente las trisomías de los cromosomas 13, 18 y 21 pueden ser viables, con prevalencias al nacimiento 23,0/10000, 5,9/10000 y 2,3/10000 respectivamente (*Walleley et al., 2012*) y en su totalidad se asocian a retraso mental y/o malformaciones congénitas. Excepcionalmente se han encontrado algunos casos de otras trisomías autosómicas, normalmente en mosaico. La trisomía 20 es la más frecuente en estudios prenatales de amniocitos aunque su repercusión clínica no está bien establecida (*Hartmann et al., 2004*), seguida de la trisomía 14 (*Von Sneidern et al., 2008*) con características que incluyen dismorfias faciales y cardiopatías.

Las aneuploidías sexuales 47, XXX, 47, XXY y 47, XYY son menos severas, observándose con mayor frecuencia en pacientes con problemas de reproducción. La frecuencia detectada en Europa es de 2/10000 nacimientos (*Walleley et al., 2012*) aunque la prevalencia estimada es mucho más alta (*Viuff et al., 2015*). Se postula que esta diferencia se debe a la ausencia de manifestaciones clínicas en un gran número de estos individuos, lo cual impide su caracterización cromosómica. Se conoce que el 90% de las trisomías para los cromosomas 21, 18 y 13 y el cariotipo 47, XXX tienen un origen materno mientras que el 50% de los síndromes de Klinefelter tienen un origen paterno.

1.4.1.2.2 Monosomías

Las monosomías autosómicas constitucionales son alteraciones cromosómicas incompatibles con la vida cuando se presentan en línea única, pudiendo ser viables en algunos casos si aparecen en mosaico. La monosomía del cromosoma X (síndrome de Turner) es la única haploinsuficiencia no letal, con una prevalencia al nacimiento de 3,3/10000 (*Walleley et al., 2012*) siendo su origen paterno en el 80% de los casos.

1.4.2 Reordenamientos Cromosómicos Estructurales (RCEs)

Las variaciones estructurales se definen como sucesos originados por roturas cromosómicas y reunión errónea en los cromosomas interfásicos o eventos de sobrecruzamiento desigual, que pueden dar lugar a cambios en el número de copias en segmentos concretos del ADN (deleciones, duplicaciones, cromosomas en anillo, cromosomas marcadores supernumerarios (sSMC) e isocromosomas), alteraciones en la orientación de segmentos cromosómicos (inversiones) y/o localización de regiones concretas (translocaciones). Otros mecanismos mutagénicos, mitóticos y meióticos (observados por estudios de CNVs en gemelos idénticos) conducen a la generación de variaciones estructurales. Estos incluyen:

- 1) Errores de recombinación, en particular recombinación homóloga no alélica (NAHR) (*Lupski JR., 1998*).

2) Errores generados en la reparación de roturas del DNA, como en la unión de extremos por recombinación no homóloga (NHEJ) (*Moore et al., 1996*) y microhomóloga (MMEJ) (*McVey et al., 2008*).

3) Errores de la replicación, como la parada de la horquilla de replicación y cambio de molde (FoSTeS) (*Lee et al., 2007*) o la replicación de roturas debidas a microhomología (MMBIR) (*Hastings et al., 2009*).

Cada uno de estos procesos genera una marca molecular determinada en los sitios de rotura de las variantes estructurales o en su proximidad. Mediante estudios de mutagénesis en *Drosophila Melanogaster* y ratones, se ha postulado que las aberraciones estructurales se presentan con más frecuencia en la espermatogénesis que en la ovogénesis. (*Chandley et al., 1991; Thomas et al., 2006; Gardner and Sutherland, 2004*).

Estas variaciones pueden ser equilibradas, las cuales no conllevan pérdida o ganancia de material genético o desequilibradas, donde una parte del genoma se pierde o se duplica, asociándose a enfermedad en muchas ocasiones (*Tuzun et al., 2005; Redon et al., 2006*). Los RCEs desequilibrados tienen un gran impacto en nacidos con malformaciones congénitas, alcanzando una frecuencia del 3%, mientras que las reorganizaciones equilibradas se detectan en aproximadamente el 2% de los casos (*Martínez-Fernández et al., 2011*), aunque la frecuencia de estos últimos en la población general se estima sea más elevada. Los portadores de RCEs equilibrados no manifiestan habitualmente rasgos clínicos que justifiquen su estudio citogenético, siendo detectados en la mayoría de los casos por problemas de infertilidad o abortos recurrentes. Habitualmente las anomalías fenotípicas asociadas a estos desequilibrios son retraso de crecimiento intrauterino, retraso mental, dismorfias y alteraciones neurológicas (*Bugge et al., 2000; Schaffer and Lupski, 2000*), estando causadas por la activación extra o deficiente de genes únicos, disrupción y/o fallos de la regulación génica durante el desarrollo embrionario.

En teoría las roturas cromosómicas para producir el intercambio de material genético asociado a la meiosis, y en ocasiones a mitosis, pueden ocurrir en cualquier punto del genoma, pudiéndose recombinar los cromosomas afectados de infinitas maneras dando lugar a un número potencial de reordenamientos resultantes muy elevado; no obstante se ha observado que existen ciertas regiones genómicas, como secuencias de ADN repetitivo o puntos frágiles, con mayor tendencia a sufrir reorganizaciones estructurales (*Warbunton D, 1991, Cohen et al., 1996, Matsuyama et al., 2004*).

La aparición de un RCEs *de novo* incrementa el riesgo de aparición de trastornos genéticos incluso cuando aparentemente se muestren equilibrados. Este hecho es debido a la posible disrupción génica o a la presencia de deleciones o duplicaciones submicroscópicas en los puntos de rotura que afecten a genes o *clusters* génicos enteros. La regulación de la

expresión de muchos genes es dependiente de su posición por lo que una variación en la posición del locus puede dar lugar a su expresión en momentos o tejidos inadecuados; este hecho se denomina “efecto de posición” y el aumento del riesgo se atribuye a menudo a la interrupción de genes o elementos reguladores. En general, las frecuencias de alteraciones estructurales en estudios prenatales presentan magnitudes muy diferentes y tamaños de muestras muy variables, dado que son recogidos sobre poblaciones seleccionadas por diferentes causas, siendo las prevalencias muy bajas (*Kjaergaard et al., 2010; Garne et al., 2010; Wu et al., 2010; Hillman et al., 2011; Faas et al., 2010*).

A continuación, se describen los diferentes tipos de RCEs:

1.4.2.1 Translocaciones recíprocas

Las translocaciones recíprocas se definen como reordenamientos originados por un intercambio de material cromosómico entre dos cromosomas no homólogos, donde generalmente el número de cromosomas permanece inalterado. El intercambio de material genético entre dos cromosomas no homólogos puede ocurrir durante la mitosis premeiótica, por recombinación meiótica en la línea germinal de los padres o mitosis post-cigóticas en estadios temprano del desarrollo embrionario (*Vanneste et al., 2009; Robberecht et al., 2013*).

Los individuos portadores de estos reordenamientos producen tasas elevadas de gametos desequilibrados que conducen a abortos recurrentes o nacidos con anomalías congénitas (*Fiorentino et al., 2011; 2012; Mokánszki et al., 2012*). La frecuencia de portadores en la población normal se estima en 1/330 (*Kochhar y Ghosh, 2013*), además

de observarse en el 0,6% de las parejas infértiles y en el 9,2% de las parejas con abortos recurrentes (*Vozdova et al., 2012*). Estos reordenamientos pueden ser transmitidos de generación en generación y se admite que la mayoría de los casos familiares tienen descendencia fenotípicamente normal resultante de gametos equilibrados (*Kim et al., 2011*). No obstante en algunos casos puede dar lugar a manifestaciones clínicas por disrupción o efectos por cambio de posición génica. Se han encontrado pocos casos de translocaciones recíprocas y su posible repercusión fenotípica cuando son heredadas de un portador sano, aunque varios autores han descrito individuos en los que se ha producido un impacto fenotípico severo debido a disomía uniparental y microdeleciones en loci adyacentes al punto de rotura (*Smeets et al., 1992; Wagstaff et al., 1995; Liao et al., 2011, Giardino et al., 2006*). Dufke et al., 2001 proponen

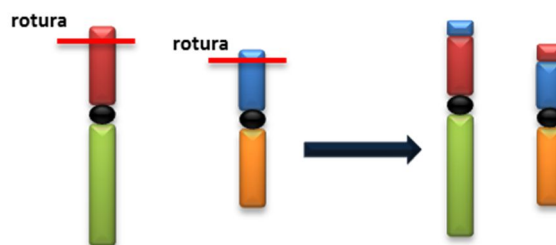


Figura 13. Esquema que representa el mecanismo de formación de una translocación recíproca.

la existencia de un mosaico oculto desequilibrado en piel como causa del fenotipo anómalo, mostrando un cariotipo en sangre periférica con translocación equilibrada.

La implementación de la metodología de Array-CGH permite actualmente la detección de reordenamientos submicroscópicos responsables de alteraciones fenotípicas derivados de esas cromosopatías (Giardino *et al.*, 2006; De Gregori *et al.*, 2007). La frecuencia de descendencia desequilibrada al nacimiento depende del tamaño y del contenido genético de los segmentos cromosómicos reestructurados (Midro *et al.*, 2006). Las translocaciones recíprocas *de novo* son hallazgos muy raros en Citogenética Clínica; no encontrándose asociación con la edad de los padres pero si en cuanto al origen de estas alteraciones, presentando una mayor proporción los portadores de sexo masculino; se postula que puede ser consecuencia del mayor número de divisiones celulares premeióticas durante la espermatogénesis (Thomas *et al.*, 2010). Recientemente se ha reseñado que, el mecanismo predominante en la formación de translocaciones recíprocas *de novo* es la recombinación homóloga no alélica (NARH), debida a repeticiones palindrómicas ricas en A-T. Los cromosomas 8, 11, 17, y 22 son los implicados con mayor frecuencia en este tipos de reordenamientos, donde la translocación t(11; 22) muestra la mayor prevalencia (Robberecht *et al.* 2013).

1.4.2.2 Translocaciones Robertsonianas (ROBs)

Estas alteraciones se producen por la fusión de los brazos largos de dos cromosomas acrocéntricos (cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22), y pérdida de ambos brazos cortos. Su frecuencia en nacidos es de 1/1000 (Hamerton *et al.*, 1975; Nielsen *et al.*, 1991; Kim and Shaffer, 2002; Bandyopadhyay *et al.*, 2002). Se ha propuesto que su elevada incidencia es debida a la similitud de las secuencias de ADN que comparten los brazos cortos de estos cromosomas, lo que les confieren susceptibilidad a reordenamientos cromosómicos (Bandyopadhyay *et al.*, 2001a); así, la región p11 de estos cromosomas incluye diferentes tipos

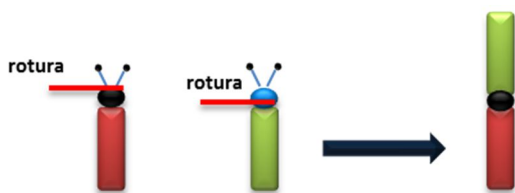


Figura 14. Esquema de la formación de una translocación Robertsoniana.

de AND satélite; la región p12, denominada "tallo", contiene múltiples copias de genes codificantes para las regiones 18S y 28S del RNA ribosomal (región organizadora del nucléolo) y la región p13 terminal incluye DNA β -satélite y secuencias teloméricas (Page *et al.*, 1996; Bandyopadhyay *et al.*, 2001b).

Todos los cromosomas acrocéntricos humanos son capaces de participar en una translocación de esta categoría, dando lugar a 15 tipos diferentes de cromosomas derivados: 5 ROBs homólogas (derivadas del mismo par cromosómico) y 10 heterólogas (resultantes de distintos cromosomas acrocéntricos), aunque se ha observado que la distribución en la

población general no es aleatoria. Específicamente, los der(13q;14q) y (14q;21q) son los más frecuentes, constituyendo aproximadamente el 85% de todas las translocaciones Robertsonianas (*Therman et al., 1989*). El 50% de estas alteraciones se originan *de novo*, de las cuales el 95% de las der(13q;14q) y (14q;21q) tienen un origen materno (*Page et al., 1997*). Se postula que el origen de las translocaciones Robertsonianas heterólogas se produce principalmente en la etapa de la meiosis I de la ovogénesis, mientras que casi todas las homólogas con origen *de novo* tienen un origen mitótico (*Nielsen et al., 1991*), con puntos de rotura dentro de una región constante (*Bandyopadhyay et al., 2002*).

Las translocaciones Robertsonianas se consideran equilibradas y su comportamiento respecto a la repercusión fenotípica es semejante a las translocaciones recíprocas, siendo relevante su implicación en la formación de gametos desequilibrados, de los cuales únicamente son viables aquellos que dan origen a trisomías 21 y 13. *Keymolen et al., 2011* observaron que la probabilidad de nacimiento de un hijo vivo sano, en embarazos de parejas portadoras de translocación Robertsoniana, oscila entre 50-70%, ya sea por concepción espontánea o por tecnologías de reproducción asistida.

Como consecuencia de la segregación meiótica en individuos portadores de translocación recíproca o Robertsoniana se pueden producir gametos desequilibrados que conducen a gestaciones viables, aunque estas cromosomopatías son sucesos raros en nacidos vivos, mostrando una frecuencia en la población de 3 cada 10.000 individuos (*Rothlisberger and Kotzot, 2007*).

1.4.2.3 Inversiones

Las inversiones cromosómicas son reordenamientos aparentemente equilibrados que se producen a partir de dos roturas en el mismo cromosoma y rotación de 180° del segmento originado, el cual se reinserta en el mismo cromosoma. Fueron las primeras variantes genéticas en ser analizadas y tienen su origen en sucesos de recombinación homóloga no alélica entre repeticiones invertidas. Su carácter equilibrado ha hecho que durante mucho tiempo se pasaran por alto, aunque estudios genómicos recientes han revelado que las inversiones son más comunes de lo que se pensaba (*Tuzun et al. 2005; Kidd, et al., 2008*). Suponen el 10% de todos los reordenamientos estructurales, de las cuales 2/3 corresponden al tipo pericéntrica (cuando las roturas se producen en los dos brazos del cromosoma incluyendo el segmento originado al centrómero) y el resto a paracéntricas (cuando las dos roturas se producen en el mismo brazo). Muchas inversiones tradicionalmente detectadas en cariotipos humanos parecen no tener efectos fenotípicos. Este es el caso de inversiones pericéntricas en los cromosomas 1, 2, 3, 5, 9, 10 y 16, las cuales invierten principalmente secuencias heterocromáticas, que se observan con frecuencia en el análisis citogenético y se consideran polimorfismos (variantes estructurales sin repercusión clínica) (*Thomas et al., 2008*).

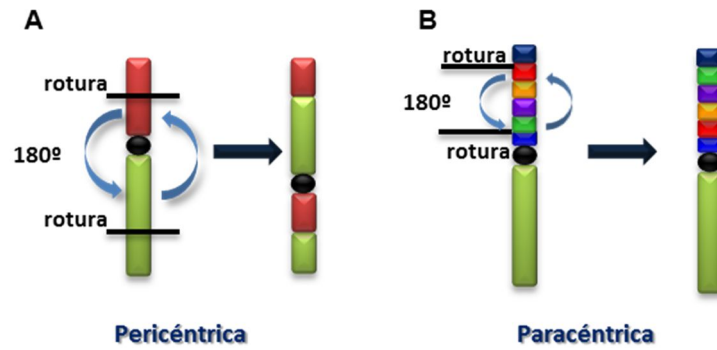


Figura 15. Esquema de la formación de inversiones. **A)** Inversión pericéntrica. **B)** Inversión paracéntrica.

Este reordenamiento estructural modifica la ordenación standard de los *loci* contenidos en el segmento cromosómico. Generalmente una inversión no provoca repercusión fenotípica en el portador, tanto cuando se presenta en heterocigosis como en los casos, poco frecuentes, de homocigosis (parentales consanguíneos), pero la recombinación en meiosis puede dar lugar a desequilibrios debido a la dificultad en el alineamiento. Normalmente, el emparejamiento exacto de los homólogos se produce a través de la formación de bucles de inversión en paquitene. En este caso, el entrecruzamiento sigue el modelo de bucle invertido, el cual asegura que los segmentos de emparejamiento del cromosoma invertido y su homólogo estén perfectamente alineados (homosinapsis) (Gardner y Sutherland, 2004). Los resultados de un entrecruzamiento aberrante entre el cromosoma normal y su homólogo invertido dan lugar a dos cromosomas complementarios recombinantes, con cromátidas portadoras de duplicación/delección recíproca y en consecuencia, gametos desequilibrados. Estos eventos pueden tener efectos sobre la fertilidad, describiéndose un mayor riesgo de aborto involuntario (Ferfour et al., 2009). También se han descrito portadores de alelos invertidos que pueden predisponer a deleciones; como sucede en el síndrome de Williams-Beuren, donde aproximadamente el 12% de los padres con hijos afectados muestran una inversión en la región cromosómica implicada en la enfermedad (Hinton et al., 2006). Resultados similares se han observado para deleciones que causan el síndrome de Angelman y el síndrome de Sotos (Gimelli et al., 2003; Visser et al., 2005). También se han referido enfermedades causadas por inversiones equilibradas, principalmente por alteración directa de un gen (Utami et al., 2014) o mediante la alteración de su expresión génica (Anger et al., 2014). Parece ser que el incremento en el riesgo de descendencia con cariotipo desequilibrados se produce cuando la longitud del fragmento invertido es mayor de un tercio de la longitud total del cromosoma (Morel et al., 2007). La frecuencia de inversiones *de novo* es mucho menor que las de origen familiar (28% vs. 72%) (Muss et al., 2007) y se asocian a repercusión fenotípica con mayor probabilidad que las heredadas, de manera que los puntos de rotura que originan estas

alteraciones pueden alterar directamente secuencias codificantes o la expresión de genes adyacentes, mediante la separación de elementos reguladores de las secuencias de codificación correspondientes, o mover los genes a diferentes dominios de regulación (Kleinjan *et al.*, 1998), como sucede en la inv(16)(p13.3q13), produciéndose la interrupción del locus Rubinstein-Taby o en la inv(X)(p11.4q22) que afecta al gen del síndrome de Norrie (Gardner and Sutherland, 2004). De manera general este riesgo varía significativamente dependiendo del cromosoma involucrado y de la región invertida, con tasas que oscilan entre < 1% hasta el 30% (Muss *et al.*, 2007).

Las inversiones que afectan a las regiones heterocromáticas son más frecuentes que las reordenadas en zonas de eucromatina. Excluyendo los polimorfismos, el cromosoma 4 es el que se detecta con mayor prevalencia en inversiones pericéntricas, mientras que los cromosomas 3 y 7 son los que tienen una mayor implicación en las paracéntricas.

1.4.2.4 Deleciones

Las deleciones se originan por la pérdida de un segmento cromosómico dando lugar a un desequilibrio en la dosis génica. En consecuencia, un portador de una deleción es haploinsuficiente para la información genética contenida en el segmento delecionado, es decir, incapacidad de la copia única para realizar las funciones del segmento en doble dosis. Esta incapacidad parece depender del tamaño delecionado, así como del número y funciones de los genes contenidos en el segmento. La incidencia de deleciones al nacimiento se estima entre 1,4-1,99/10000 (Thompson and Thompson, 2008; Wallesley *et al.*, 2012; Forrester and Merz, 2007). Estos autores postulan además que las deleciones no están asociadas a la edad materna en el momento del embarazo.

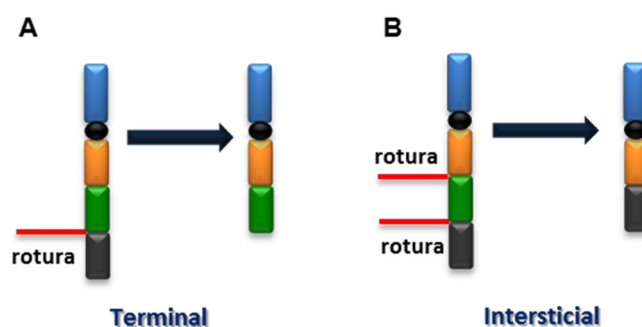


Figura 16. Esquema de la formación de deleciones. **A)** Deleción terminal. **B)** Deleción intersticial.

En cuanto a su origen, estas alteraciones pueden producirse a partir de una única rotura en un extremo del cromosoma (deleción terminal) y pérdida del segmento originado o mediante dos roturas seguida de la pérdida de la región intersticial y la posterior unión de los segmentos restantes, tanto en el brazo p como en brazo q (deleción intersticial). El segmento intercalar,

que no contiene centrómero, puede permanecer en forma lineal o formar un anillo acéntrico cuando es de gran tamaño, que se perderá en la siguiente división celular independientemente de su morfología. Estas alteraciones son consecuencia de una segregación anormal en gametos de individuos portadores de reordenamientos equilibrados o bien se producen por recombinación homóloga no alélica o roturas y reunión errónea en los cromosomas interfásicos cuando se detectan *de novo*, estimándose el riesgo de recurrencia en 0,5% (Gardner y Sutherland, 2004) y en ocasiones frecuencias poblacionales más altas son la delección del brazo corto del cromosoma 5 y la delección en la región 22q11.2, con un incidencia de 1:50.000 y 1:4.000 nacidos, respectivamente (Devriendt et al., 1998; Mainardi et al., 2001).

1.4.2.5 Duplicaciones

Las duplicaciones pueden ser consecuencia de una segregación anormal en la meiosis de portadores de translocación o inversión equilibrada, aunque su origen es habitualmente *de novo* (Kotzot et al., 2000). Son anomalías cromosómicas raras, con una prevalencia en nacidos de 0,7 por 10000 (Walllesley et al., 2012).

Se diferencian dos tipos de duplicaciones de acuerdo con la orientación del fragmento duplicado: en tándem o desplazada y dentro de cada una de ellas dos subgrupos (directa o inversa). En ambos tipos se produce un desequilibrio de dosis génica, lo que hace que estos ordenamientos se incluyan en la categoría de RCEs desequilibrados.

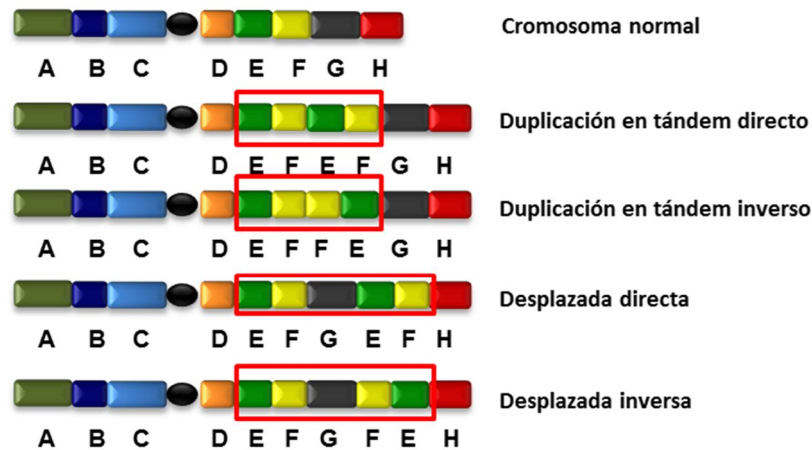
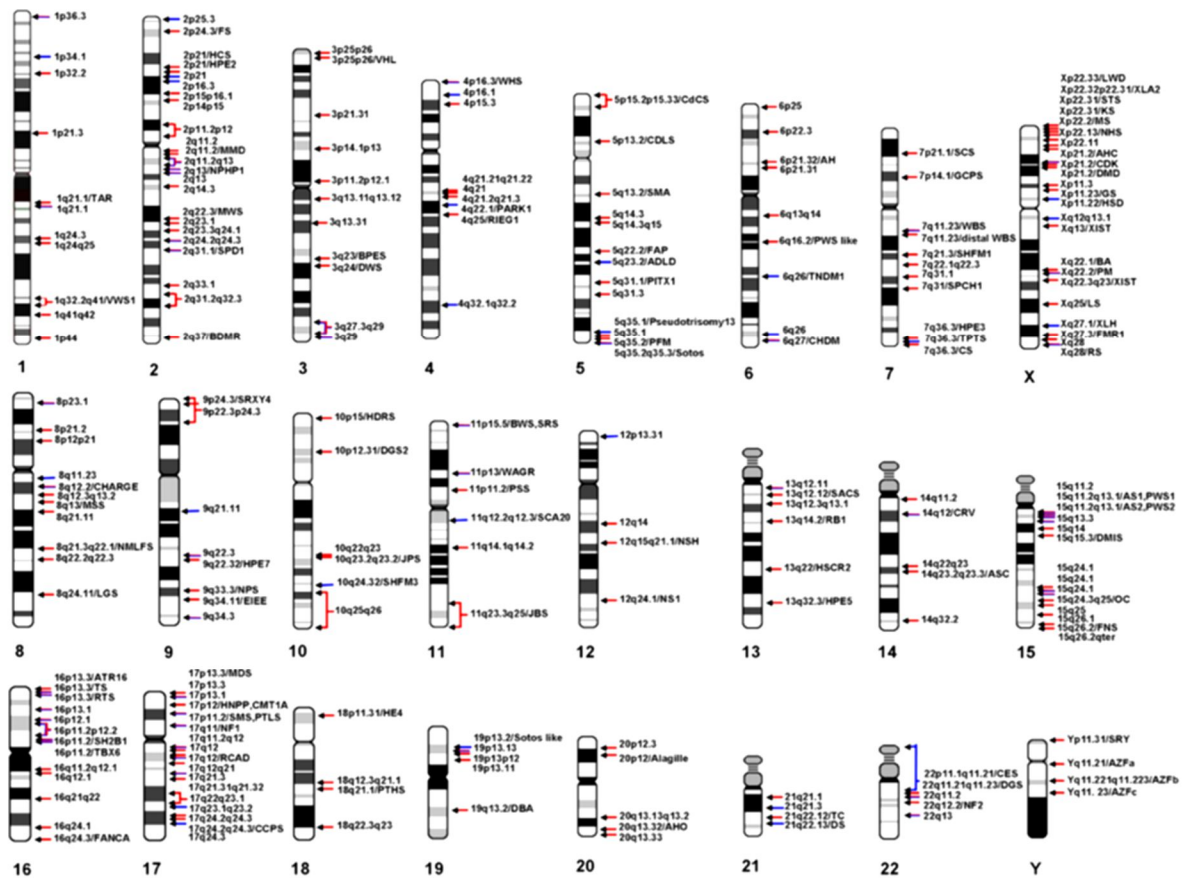


Figura 17. Esquema que representa el mecanismo de formación de los diferentes tipos de duplicaciones.

Estos reordenamientos parecen tener menor repercusión clínica que las delecciones y se estima que su incidencia en la población general es aproximadamente de 1 cada 4000 individuos (Bonaglia et al, 2005). Aunque no existen muchas series analizadas respecto a las manifestaciones clínicas de la duplicaciones, los casos descritos refieren desde individuos con fenotipos normales (únicamente reflejan abortos de repetición) hasta múltiples anomalías congénitas y retraso psicomotor.

Mediante técnicas de citogenética molecular se han podido identificar duplicaciones asociadas a diversas síndromes clínicas bien definidos, como la microduplicación 3q26.1 (síndrome de Cornelia de Lange; *Rizzu and Baldini, 1994*) y la microduplicación 11p15 (síndrome de Beckwith-Wiedemann; *Brown et al., 1992*). Por último, también se han descrito microduplicaciones asociadas a síndromes de microdelección, como sucede en el síndrome DiGeorge/Velocardiofacial (*Ensenauer et al., 2003*), donde microduplicaciones de la región 22q11.2 presentan algunas características fenotípicas semejantes a este síndrome. Estas observaciones sugieren la existencia de un mismo mecanismo de formación de deleciones y duplicaciones. En los últimos años las metodologías basadas en array-CGH han permitido identificar un gran número de microduplicaciones y microdeleciones. En la Figura 17 se muestra la representación esquemática de las regiones cromosómicas implicadas en microdeleciones y microduplicaciones, recogidas al menos dos veces en la bibliografía, en una revisión realizada por *Weise et al. en 2012*.



constitución cromosómica normal o sustituyendo al cromosoma del que se originan. Estudios moleculares han demostrado que gran parte de los isocromosomas están formados por brazos cromosómicos idénticos, no homólogos, lo cual sugiere un mecanismo de formación predominante basado en el intercambio de cromátidas hermanas (Callen et al., 1987; Harbison et al., 1988; Robinson et al., 1994).

Los mecanismos que dan lugar a estos reordenamientos pueden suceder empíricamente en todos los cromosomas, aunque solamente para los que afectan a los isocromosomas 5p, 8p, 9p, 12p, 18p, Xq, Yq e Yp se ha encontrado el fenotipo específico asociado (Brock et al., 2012; Lin et al., 2005). Se trata de alteraciones con prevalencia poblacional muy baja, dentro de las cuales el [iso(Xq)] es el que se ha observado con mayor frecuencia.

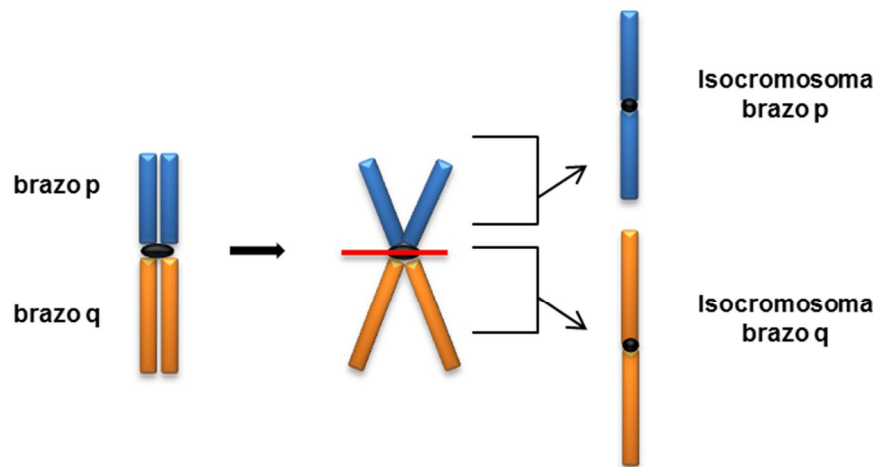


Figura 19. Esquema que representa el mecanismo de formación de un isocromosoma para los brazos p y un isocromosoma para los brazos q.

1.4.2.7 Cromosomas en anillo

Los cromosomas en anillo se forman habitualmente como resultado de una rotura producida en ambos brazos de un mismo cromosoma, con la consiguiente fusión de sus extremos y pérdida de los segmentos distales. También se pueden originar mediante fusiones subtelo méricas o fusión telómero-telómero sin pérdida de material, dando lugar a un cromosoma en anillo completo (Vermeesch et al., 2002; Le Caignec et al., 2004; Sigurdardottir et al., 1999) o con pérdida de material genético contenido en estas regiones, originando síndromes de Microdelección Subtelomérica (Schinzel A, 2001).

Estos reordenamientos se han descrito en todos los cromosomas humanos y se caracterizan por una elevada inestabilidad mitótica que ocasiona diferentes niveles de mosaicismo (denominado mosaicismo dinámico; Gardner y Sutherland, 1996), los cuales incluyen células diploides, células diploides con cromosoma en anillo supernumerario (trisomía parcial) y células donde el cromosoma en anillo ha reemplazado a uno de los cromosomas homólogos del cual se origina (resultando haploinsuficiencia para los genes distales de ese

cromosoma), así como eventos de disomía uniparental (Zollino *et al.*, 2009). No existe correlación entre el tamaño del anillo y la inestabilidad mitótica, o si se trata de un anillo completo o con deleciones terminales (Sodre *et al.*, en 2010). Incluso individuos con el mismo cromosoma en anillo muestran diferentes patrones de mosaicismo postmitótico.

De manera general se observa un fenotipo recurrente caracterizado por retraso severo del crecimiento y malformaciones menores (Cote *et al.*, 1981).

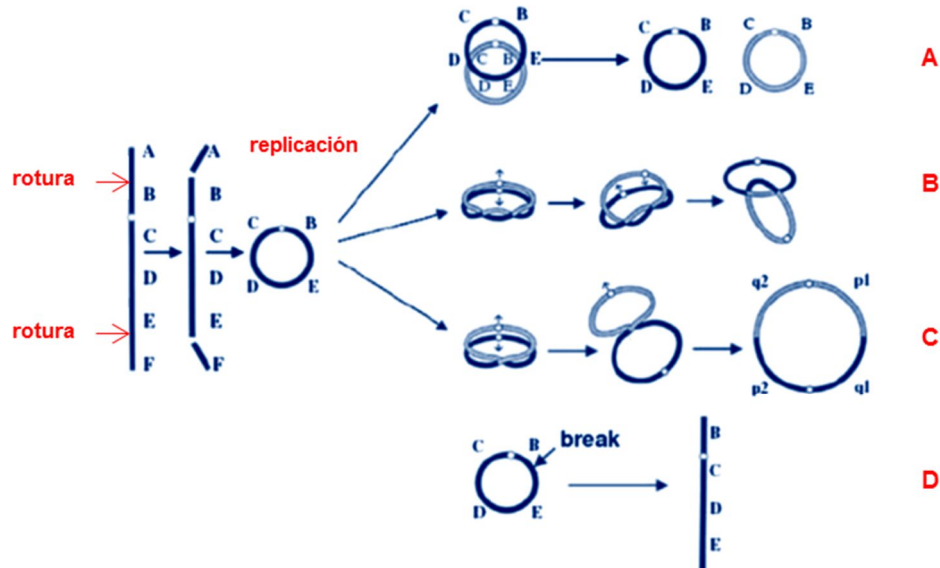


Figura 20. Esquema de la formación de un cromosoma en anillo y su inestabilidad después de la replicación, producida por intercambio de cromátidas o roturas, dando lugar a diferentes estructuras. **A)** Dos anillos monocéntricos. **B)** Dos anillos entrelazados. **C)** Un anillo dicéntrico de tamaño doble y **D)** Un anillo roto o abierto (Sodre *et al.* (2010).

1.4.2.8 Cromosomas marcadores supernumerarios (sSMC)

Los cromosomas marcadores supernumerarios son estructuras cromosómicas indeterminadas, que no pueden ser caracterizados con las técnicas de citogenética convencional y cuyo tamaño es igual o inferior a un cromosoma 20 de la misma metafase. En esta categoría de RCEs pueden también incluirse otras estructuras como inversiones-duplicaciones (inv-dup), dobles minutos (Liehr *et al.*, 2004), y en ocasiones cromosomas en anillo, cuando son de pequeño tamaño. Habitualmente aparecen de forma adicional a los 46 cromosomas normales del cariotipo y se presentan en forma de mosaicos cromosómicos debido a sucesos de inestabilidad mitótica.

En cuanto a su origen, aproximadamente un 60% de los casos de sSMS son *de novo* con una ratio 2:1 en cuanto al origen materno frente al paterno. Pueden originarse a partir de cualquiera de los cromosomas del complemento, aunque el 70% de los sSMC derivan de los brazos cortos y de la región pericéntrica de los cromosomas acrocéntricos (Liehr *et al.*, 2004a;

2010), siendo el cromosoma 15 el más frecuentemente implicado, seguido del cromosoma 22 (Crolla et al., 2005).

Los posibles mecanismos de formación de los sSMC son los siguientes: (1) Si el sSMC deriva de cromosomas acrocéntricos (es decir, 13, 14, 15, 21 y 22), como derivados de duplicaciones invertidas (inv dup), un posible mecanismo de origen es mediante intercambios de tipo U durante la meiosis (Sheth et al., 2009), con formación de un tetrasomía parcial de los brazos cortos de estos cromosomas, asociándose a un fenotipo normal; este mecanismo también puede producirse, aunque de manera menos frecuente, en el caso de cromosomas no acrocéntricos, dando lugar en este caso a un fenotipo anormal (Murmman et al., 2009). (2) Un sSMC también se puede formar en conexión con un rescate trisómico, siendo la mayoría cromosomas dobles minutos (Liehr et al., 2011). (3) Aproximadamente el 50% de sSMCs se originan como consecuencia de la formación de un cromosoma en anillo (Baldwin et al., 2008).

La repercusión clínica es variable dependiendo del origen y naturaleza del material genético implicado, mostrando una frecuencia en nacidos vivos del 0,44 por 1000, mientras que en individuos con retraso mental se estima en el 2,88 por 1000 (Liehr et al., 2007). El 70% de los individuos portadores de sSMC son fenotípicamente normales aunque existen casos que presentan problemas de infertilidad: azoospermia, amenorrea y aborto habitual (Balkan et al., 2010; Paetzold et al., 2006). El 30% restante pueden presentar diferentes fenotipos clínicos, incluyendo alteraciones en los patrones de crecimiento y desarrollo, así como trastornos de aprendizaje o problemas de salud. Además, hay algunos sSMCs que dan lugar a síndromes concretos, como sucede con el sSMC derivado del brazo corto del cromosomas 12 que origina el síndrome de Pallister-Killian (Vermeesch et al., 2005) y el derivado del brazo corto del cromosoma 22, que da lugar al síndrome de Ojo de gato (Footz et al., 2001).

1.4.2.9 Heteromorfismos y Polimorfismos

Las variaciones de tamaño, morfología o patrón de bandas que no se acompañan de efectos clínicamente relevantes se denominan “heteromorfismos” (Wyandt et al., 2011), las cuales presentan frecuencias poblacionales inferiores al 1% e incluso restringidas a una única familia. El término “polimorfismo” se encuentra actualmente en desuso debido a que se refiere a variaciones presentes al menos en el 1% de la población. Dentro de estas variantes se encuentran los alargamientos de las zonas heterocromáticas de los cromosomas 1, 9, 16 e Y (Liehr et al., 2006). Las variaciones en la longitud del brazo corto de los cromosomas acrocéntricos son también consideradas variantes dentro de la normalidad (Kowalczyk et al., 2007).

Debido al carácter ambiguo de los criterios de identificación, la ausencia de relevancia clínica y el riesgo de interpretación errónea por personas sin suficiente formación citogenética, la *European Cytogeneticists Association* (ECA) recomienda no incluirlos en los informes

citogenéticos (*Hastings et al., 2007*). Esta actitud es de fácil aplicación en heteromorfismos bien descritos, como la inversión heterocromática del cromosoma 9. No obstante, cuando se trata de variantes con características infrecuentes se debe intentar correlacionar con un fenotipo normal mediante el estudio de los progenitores (*Lloveras et al., 2013*).

1.5 Indicaciones para realizar diagnóstico prenatal invasivo

Las frecuencias de anomalías cromosómicas detectadas en el ámbito del Diagnóstico Prenatal Citogenético muestra un rango muy amplio que oscila entre 0,27-6,7%, debido a la heterogeneidad de las distintas poblaciones analizadas en las series, junto con los diferentes periodos de tiempo analizados, la disponibilidad en los distintos grupos de trabajo de tecnologías para realizar el análisis citogenético y los diferentes criterios de selección de gestantes en riesgo de cromosopatía utilizados (*Méndez-Rosado et al., 2014; Han et al., 2008; Gaudry et al., 2012; Tseng et al., 2006; Danisman et al., 2013; Mademont-Soler et al., 2011; Caron et al., 1999; Chang et al., 2012; Zhang et al., 2011; Karaoguz et al., 2006; Balkan et al., 2010, 2011; Ocak et al., 2014; Nishiyama et al., 2015*).

La trisomía 21 es la alteración numérica más prevalente (0,66-2,62%) (*Chang et al., 2012; Hang et al., 2008; Mademont-Soler et al., 2011; Ocak et al., 2014; Ekin et al., 2014; Nishiyama et al., 2015*), la cual se presenta en el 95% de los casos como trisomía primaria como consecuencia de no disyunción durante la meiosis y dependiente de la edad materna. Los casos originados por translocación o mosaicismo representan el resto de los casos con esta alteración (*Cuckle et al., 2005*) seguida de la trisomía 18, que muestra tasas entre el 0,21-0,50% (*Karaoguz et al., 2006; Mademont-Soler et al., 2011, Han et al., 2008, Ekin et al., 2014; Méndez-Rosado et al., 2014; Ocak et al., 2014, Balkan et al., 2010, 2011; Chang et al., 2012*).

Aunque presentan una menor frecuencia en los estudios citogenéticos prenatales, el hallazgo de un RCE *de novo* supone un reto para el asesoramiento parental, agravado por el escaso número de referencias bibliográficas que informen sobre su repercusión clínica. La prevalencia de RCEs equilibrados *de novo* se encuentra entre 0,06%-0,56% (*Karaoguz et al., 2006, Giardino et al., 2009; Tseng et al., 2006; Balkan et al., 2010, 2011*) mientras que los desequilibrios estructurales se detectan en menores tasas (0,10%-0,55%) (*Karaoguz et al., 2006; Wu et al., 2013; Yakut et al., 2014; Han et al., 2008; Chang et al., 2012; Mademont-Soler et al., 2011; Nishiyama et al., 2015; Balkan et al., 2010, 2011; Ekin et al., 2014*).

En la actualidad, los criterios de selección de las gestantes en riesgo de cromosopatía se dividen en dos grandes grupos:

- *Factores de riesgo preconceptionales*: este grupo comprende a gestantes con edad materna ≥ 40 años, progenitor portador de una anomalía cromosómica (translocaciones

equilibradas, translocaciones Robertsonianas, inversiones, cromosomas marcadores), historia obstétrica con abortos de repetición e hijo anterior con cromosomopatía *de novo*.

- *Factores de riesgo intragestacionales*: sospecha de la existencia de una cromosomopatía fetal a partir de la aplicación de un programa de cribado prenatal de alteraciones cromosómicas fetales (cribado combinado del 1º trimestre y/o marcadores ecográficos).

1.5.1 Parejas portadoras de reordenamiento cromosómico (PPR)

Como hemos citado anteriormente, los portadores de reordenamientos estructurales presentan un riesgo incrementado en la segregación de gametos desequilibrados durante la meiosis, originados por configuraciones inusuales en el emparejamiento de los cromosomas derivados de la translocación y sus homólogos normales. Los datos procedentes de estudios prenatales preimplantacionales sugieren que los cromosomas translocados pueden tener además un impacto negativo sobre la separación del resto de cromosomas normales del complemento (Efecto Inter-cromosómico; ICE) que conduciría a un aumento en el riesgo de gestaciones aneuploides (*Gianaroli et al., 2002; Vozdova et al., 2011*). Los trabajos más recientes ponen de manifiesto que el incremento de embriones aneuploides en parejas portadoras de translocación recíproca no es significativo frente a los grupos control, mientras que en portadores de inversión los datos no son concluyentes. Las Translocaciones Robertsonianas son el único tipo de reordenamiento en el que se identificaron claramente ICEs, revelando un aumento altamente significativo para aneuploidías en las etapas de división embrionaria (no detectándose en los gametos ni en el estadio de blastocisto), lo que demuestra una fuerte evidencia del impacto de la reorganización durante las mitosis postcigóticas (*Alfarawati et al., 2012*).

Respecto a los padres portadores de aneuploidía, la frecuencia poblacional de mujeres con cariotipo 47, XXX es muy baja, aunque durante la meiosis pueden generar gametos desequilibrados para los cromosomas sexuales, por lo cual está indicado realizar estudio citogenético en estos casos, siendo este hallazgo similar para los varones 47, XYY.

1.5.2 Gestantes con historia de abortos (HA)

Conocer si un aborto espontáneo ha sido causado por una cromosomopatía evita el empleo de pruebas y procedimientos adicionales para encontrar otras causas responsables de las pérdidas gestacionales, además de permitir la evaluación y el asesoramiento genético a los padres y establecer un pronóstico para futuros embarazos.

La pérdida recurrente de gestaciones se define como “dos o más abortos anteriores a la 20ª semana gestacional o la pérdida de dos o más fetos de manera consecutiva de menos de 500 gramos de peso” (*Rai et al., 2006*). Aproximadamente el 15% de los embarazos clínicamente

reconocidos terminan en abortos espontáneos (Kuo et al., 2004). Respecto a la etiología de estos sucesos, las causas son multifactoriales, incluyendo factores ambientales, genéticos, anatómicos, endocrinos, inmunológicos y enfermedades trombofílicas e infecciosas (Hogge et al., 2003). El 50% de los abortos del primer trimestre se deben a una causa cromosómica, fundamentalmente trisomías (52% de los casos), siendo las más frecuentes la trisomía 16 (31%), trisomías 22 y 21 (10%) y trisomía 15 (7%); la prevalencia de poliploidías es del 22%, seguido de las monosomías (18%). El resto de anomalías cromosómicas corresponden a alteraciones estructurales y mosaicismos (7%) (Foresta C, 2002).

Los individuos portadores de translocaciones equilibradas se identifican mayoritariamente a partir de los estudios citogenéticos realizados en descendencia afectada de malformaciones congénitas o en parejas con pérdidas fetales recurrentes. La prevalencia de portadores equilibrados en parejas con abortos de repetición se encuentra entre el 4-6%, ya sean recíprocas (2/3 de los casos) o Robertsonianas (1/3) (Hirshfeld-Cytron et al., 2011; Sugiura-Ogasawara et al., 2008; Franssen et al., 2006). Estudios realizados sobre 278 parejas portadoras de translocación con pérdidas recurrentes, demuestran que su principal riesgo para gestaciones posteriores es un nuevo aborto involuntario, mientras que la posibilidad de descendencia desequilibrada viable es casi inapreciable (0,4%) (Franssen et al., 2008).

Los cromosomas 6, 7 y 22 son los que aparecen con mayor frecuencia implicados en las translocaciones recíprocas encontradas en parejas con abortos de repetición. En las translocaciones Robertsonianas, el cromosoma 14 está implicado en el 75% de los casos y el 13 en el 67,5% (Campana et al., 1986.)

1.5.3 Hijo anterior con cromosomopatía *de novo* (HCN)

El riesgo de recurrencia para trisomía 21 es una constante determinada por la edad de la madre en el primer embarazo afecto, siendo este riesgo mayor cuando la gestación trisómica previa se ha producido con una edad inferior a los 35 años (Morris et al., 2005). Los datos publicados por De Souza et al., 2009, sobre una serie de 6000 gestantes con embarazos anteriores afectados de trisomía 13, 18 o 21, establecen los riesgos de recurrencia para la misma o diferente trisomía, en función de la edad materna cuando se produjo el primer evento trisómico.

Edad materna en la gestación previa	Riesgo relativo misma trisomía (95% IC)	Riesgo relativo diferente trisomía(95% IC)
< 35 años	3,5	1,3
≥ 35 años	1,7	1,5

Tabla 1. Riesgos de recurrencia para trisomías en función de la edad materna en la gestación trisómica previa (De Souza et al., 2009).

La recurrencia de una alteración estructural *de novo* puede deberse a tres razones principales: (A) Recurrencia al azar, (B) Mosaicismo gonadal, definido como una línea celular restringida a las gónadas que abarca más de 1% de las células y no está presente en otros tejidos y (C) Mosaicismo de bajo grado somático-gonadal en uno de los padres (*Röthlisberger et al., 2007*). Únicamente se han descrito en la bibliografía 29 casos de recurrencia para estas alteraciones, lo que resulta un número muy bajo teniendo en cuenta el riesgo empírico, el cual se estima en 0,02-0,05% (*Röthlisberger et al., 2007; Gardner and Sutherland, 2004*), por lo que el riesgo real posiblemente sea más bajo. A pesar de estos datos, se debe realizar un Consejo genético a la pareja transmitiendo esta información y si lo requieren, proceder a una prueba invasiva para mitigar las posibles implicaciones psicológicas en el embarazo en curso.

De manera general, el riesgo de recurrencia de cromosomopatías en estas gestantes se establece en 1% (*Caron et al., 1999; Warburton et al., 2004*).

1.5.4 Ansiedad materna (AM)

Históricamente se ha contemplado esta indicación para realizar diagnóstico invasivo en mujeres que manifiestan un elevado *stress* psicológico frente a la gestación, con efectos negativos tanto para la gestante como para su entorno familiar.

1.5.5 Edad materna avanzada (EMA)

La asociación entre edad materna y trisomía fue establecida por Penrose LS. en 1933, basándose en las observaciones sobre individuos con rasgos mongólicos. El primer método de cribado para la detección de trisomía 21, introducido a principios de los años 70, se basaba en su asociación con la edad materna avanzada, según los resultados de estudios realizados sobre la prevalencia del Síndrome de Down en recién nacidos y la edad de la madre en el momento de la concepción (*Hook and Chambers, 1977; Warburton and Miller, 1972*). Así el riesgo para mujeres con edad entre 25-29 años se estimaba en 1/1.200, entre 30 y 34 años 1/800, mientras que entre 35 y 39 años ascendía a 1/290 y para edades superiores a 40 años el riesgo estimado era de 1/100. La amniocentesis fue ofertada inicialmente únicamente a gestantes con edad ≥ 40 años, momento en el cual se equilibraba el coste-beneficio de la prueba. De forma gradual, a medida que la práctica de la prueba invasiva se extendió y aparentaba ser “segura”, el grupo de “alto riesgo” fue redefinido e incluyó mujeres de un mínimo de 35 años de edad. Este grupo constituía el 5% de la población embarazada e incluía el 30% del número total de los fetos con trisomía 21. Revisiones posteriores demostraron una baja sensibilidad de la edad materna como método de selección además de una tasa de falsos positivos muy elevada (*Ferguson-Smith MA, 1976*). Análisis demográficos posteriores han mostrado que las mujeres han retrasado el momento de sus embarazos, lo que ha supuesto que el número de gestaciones con edad materna avanzada se haya triplicado en los últimos 30

años, alcanzando el 15% de la población general y representando el 50% de los fetos afectados con trisomía 21. Este incremento ha producido una creciente demanda de asesoramiento genético prenatal para predecir el riesgo de anomalías cromosómicas (Bornstein et al., 2009; Resta et al., 2005). Estudios más recientes corroboran el aumento significativo de las tasas de aneuploidías con el aumento de la edad materna, de manera que cada año adicional en la edad de la madre incrementa el riesgo de aneuploidías 1,16 veces (Park et al., 2010).

Además de la edad materna, para establecer el riesgo de aneuploidía, se debe considerar la edad gestacional a la cual se realiza la valoración del riesgo, dado que la probabilidad de gestaciones con trisomía 21, 18 y 13 disminuye con la edad gestacional como consecuencia de la elevada letalidad intraútero que presentan estos fetos cuando se comparan con gestaciones euploides. Así, la tasa de muerte fetal entre las 12ª semana gestacional y el parto es aproximadamente del 30% para la trisomía 21 y del 80% para las trisomías 18 y 13. En contraste, la tasa de muerte fetal en fetos euploides se estima en 1-2%. La prevalencia del síndrome de Turner también disminuye durante la gestación, siendo de 1 en 1500 a las 12ª semana y 1 en 4000 a las 40ª semana. El resto de anomalías cromosómicas sexuales (47, XXX, 47, XXY y 47, XYY) no presenta un cambio significativo a lo largo de la gestación (Halliday et al., 1995; Snijders et al. 1994, 1995, 1999; Morris et al., 1999). Respecto a las alteraciones estructurales *de novo*, estas anomalías se consideran hallazgos ocasionales que no muestran asociación significativa con la edad materna (Ferguson-Smith et al., 1984; Forobosco et al., 2009).

De cualquier modo, aunque la edad materna como único criterio para la selección de embarazadas en riesgo de cromosopatía se considera obsoleto, en base a las recomendaciones del *American College of Obstetricians and Gynecologists, 2007* ("no se debe utilizar la edad materna ≥ 35 años como umbral para ofrecer una prueba prenatal invasiva"), en Europa se contemplan tramos de edad más elevados para recomendar amniocentesis genética, así en Francia se establece el punto de corte en edad ≥ 38 años (Dupont et al., 2007), mientras que en los Países Bajos se recomienda realizar el estudio a partir de los 36 años (Lichtenbelt et al., 2011). La Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) recomienda realizar prueba invasiva en gestantes con edad ≥ 40 años, ya que en ese momento se equilibra la relación coste-beneficio de la prueba (1% de riesgo de pérdida fetal).

Respecto a la edad paterna, varios estudios han demostrado los efectos de su incremento en la incidencia de aberraciones cromosómicas (Hook and Regal, 1984), aunque los mecanismos moleculares son aún poco conocidos. McIntosh et al., 1995 ya encontraron que el riesgo de aneuploidía puede aumentar al doble cuando se comparan grupos con edad mayor de 50 años con grupos controles con edades comprendidas entre los 25-29 años. Además, Griffin et al., 1996 describen que la incidencia de espermatozoides con disomía 18 aumenta significativamente a partir de los 50 años

En cualquier caso, la decisión final de realizar o no un estudio invasivo debe residir en la gestante. En el momento actual, el criterio de selección por edad materna avanzada no se considera un marcador sensible para la selección de gestantes con riesgo de cromosomopatía.

1.5.6 Marcadores bioquímicos en suero materno

Como hemos reflejado anteriormente, la detección del 50% de las posibles gestaciones con síndrome de Down en gestantes mayores de 35 años en base a la edad materna, deja una fracción significativa sin identificar dado que su sensibilidad se estima en un 30%, además de aquellos casos que se producen en mujeres con edades inferiores a este punto de corte.

La búsqueda de otros factores que ayuden a optimizar el cálculo del riesgo en todas las gestantes ha sido un objetivo implementado en el Diagnóstico prenatal citogenético desde hace varias décadas. Estas investigaciones se basaron en los hallazgos de *Brosk and Sutcliffe* en 1972, que describían niveles elevados de alfafoproteína (AFP) en el líquido amniótico de gestaciones con fetos que mostraban defectos de cierre del tubo neural.

1.5.6.1 Marcadores bioquímicos del segundo trimestre

Los hallazgos descritos anteriormente permitieron la introducción, durante los años 80, de nuevos métodos de tamizaje que consideraban no sólo la edad de la madre, sino también la concentración de varios productos fetoplacentarios en la circulación materna para la detección de aneuploidías fetales, fundamentalmente trisomía 21. *Merkatz et al.*, 1984 describieron una asociación de esta alteración con niveles de AFP materna inferiores a los encontrados en los controles, permitiendo un incremento del 20% en la identificación de estas patologías en gestantes menores de 35 años.

Una vez conocido que determinados compuestos presentes en el suero materno podían proporcionar información sobre el riesgo para síndrome de Down, la búsqueda se dirigió a la identificación de nuevas moléculas que pudieran optimizar el cribado de cromosomopatías. *Canick et al.*, 1988 demostraron la asociación significativa de niveles bajos de estriol no conjugado (uE3) con gestaciones afectas de trisomía 21. Posteriormente *Macri et al.*, 1990 establecieron que la combinación de AFP y la fracción libre β -hCG, junto con la edad materna, alcanzan una tasa de detección del 80% para trisomía 21. Otro marcador que incrementó la tasa de detección fue la Inhibina A (*Cuckle et al.*, 1996).

La implementación de estos test mejoraba sustancialmente la identificación de fetos con trisomía 21 cuando se comparaban con el *screening* por edad materna, pasando del 30% al 60-65% con la combinación de edad materna-AFP sérica- β hCG libre (doble test). El triple test incorporó el análisis de concentración de uE3, alcanzando una tasa de detección del 65-70% y hasta el 70-75% con la incorporación de inhibina A (cuádruple test) (*Cuckle et al.*, 2005; *Wald et al.*, 2003; *Benn et al.*, 2011).

1.5.6.2 Marcadores bioquímicos del primer trimestre

El interés de anticipar los resultados citogenéticos al primer trimestre de gestación dio lugar a ensayos con marcadores bioquímicos durante las doce primeras semanas de gestación. *Brambati. et al.* describieron en 1993 la asociación de niveles bajos en suero materno de la proteína plasmática asociada al embarazo (PAPP-A) con anomalías cromosómicas, de manera que era posible detectar el 60% de los casos con trisomía 21, con una tasa de falsos positivos del 5%. Además *Spencer et al., 1992* detectaron niveles elevados de β -hCG libre en el suero materno de gestaciones con trisomía 21.

Se han testado diferentes combinaciones de marcadores bioquímicos para estimar el rendimiento en la detección de aneuploidías. *Wald et al., 1996* concluyeron que el rendimiento de la estimación del riesgo, utilizando la edad materna y la fracción libre de β -hCG junto con la PAPP-A a las 10^a semana de embarazo, era superior que el doble test (AFP y hCG con la edad materna) y similar a la prueba de triple test (AFP, uE3 y hCG con la edad materna) entre 15^a-22^a semana gestacional.

Este método de cribado se debe complementar con otros datos tales como el origen racial, peso, tabaquismo y método de concepción (factores que modifican las concentraciones de los marcadores bioquímicos), junto a los reactivos y equipos utilizados, para la definición de los múltiplos de la mediana (MoMs) antes de comparar las gestaciones afectadas con las no afectadas (*Kagan et al., 2008*). En las gestaciones de fetos con trisomía 21, la concentración en suero materno de β hCG es dos veces más elevada (2.0 MoM) que en fetos euploides (1.0 MoM), mientras que la concentración sérica materna de PAPP-A se reduce a la mitad (0.5 MoM). En las gestaciones de fetos con trisomía 18 o 13, las concentraciones séricas de β hCG libre y PAPP-A muestran una ligera disminución frente a gestaciones euploides. Las gestantes con triploidía digénica presentan valores séricos de β hCG libre y PAPP-A significativamente disminuidos cuando se comparan con fetos euploides (*Tul et al., 1999; Spencer et al., 2000*).

1.5.7 Cribado combinado del primer trimestre (CC1)

Las referencias respecto a las variaciones de las concentraciones de PAPP-A y fracción libre de β -hCG en suero materno, junto con los resultados de *Nicolaidis et al., 1992* que identifican un aumento del grosor de la translucencia nuchal (TN) en fetos con trisomía 21 (posteriormente describiremos este marcador ecográfico), condujo a una nueva perspectiva en la estimación del riesgo de aneuploidías.

La combinación de estos marcadores bioquímicos con la medida de la translucencia nuchal y la edad materna, mediante el desarrollo de algoritmos matemáticos basados en funciones de distribución de Gauss de los diversos marcadores, ha llevado a la detección del 90% de los casos de síndrome de Down, con una tasa de falsos positivos del 5% (*Spencer et al., 1999*). Este método se denomina “Cribado combinado del primer trimestre” y fue

implementado en el Reino Unido en el año 2000 como el método más eficaz para asesoramiento del riesgo. El algoritmo clasifica a las gestantes en “alto riesgo” y “bajo riesgo” en función de la cifra obtenida; así, cuando el riesgo es menor de 1/270 se ofrece la posibilidad de realizar prueba invasiva (*Spencer et al., 2000*).

En los últimos años se han establecido, de manera consensuada, los criterios para realizar este test combinado. Se considera que el cálculo de las concentraciones de los marcadores bioquímicos se deben realizar entre la 9^a-10^a semana gestacional, ya que la diferencia de concentración de PAPP-A entre embarazos trisómicos y euploides es mayor en edades gestacionales tempranas, a pesar de que la diferencia de β hCG libre entre fetos aneuploides y fetos euploides aumenta con la edad gestacional, pero la diferencia proporcional es menor que en la PAPP-A (*Kagan et al., 2008; Wright et al., 2010*). La medición del grosor de la translucencia nucal se debe realizar a la 12^a semana gestacional, obteniendo bajo estos criterios un aumento en la tasa de detección hasta del 90-94% (*Borrell et al., 2004; Kagan et al., 2008; Wright et al., 2010*).

Existen diversas covariables que influyen en la especificidad y sensibilidad de los marcadores bioquímicos del primer trimestre como son el peso materno, consumo de tabaco, raza y embarazo gemelar. Sin embargo, el género del feto, que la madre sea insulino dependiente o la necesidad de aplicar técnicas de reproducción asistida en el embarazo suponen una menor influencia en el rendimiento del test (*Tislaric-Medenjak et al., 2010*). También se han propuesto correcciones para los valores del riesgo considerando la longitud craneocaudal (CRL). Estas covariables están incluidas en un algoritmo definido por *Kagan et al.* en 2007.

Si al Cribado Combinado del primer trimestre se incorporan otros marcadores ecográficos, la tasa de detección aumenta hasta el 96%, disminuyendo la tasa de falsos positivos al 2.5%. (*Kagan et al., 2009a; Kagan et al., 2009b; Maiz et al., 2009*).

1.6 Marcadores ecográficos (ME)

El concepto de marcador ecográfico se define como “un hallazgo en estudio con ultrasonidos que representa una variante anatómica de la normalidad, que a pesar de no ser necesariamente una malformación estructural, está asociado a un mayor riesgo de cromosomopatía”.

La cantidad de marcadores ecográficos descritos no ha hecho sino crecer incesantemente en los últimos 20 años (*Lockwood et al., 1987; Benacerraf et al., 1989, 1991; Bromley et al., 2002; Fitz-Simmons et al., 1989; Benacerraf et al., 1991; Nyberg et al., 1998; Bromley et al., 1993; Shipp et al., 2001; Cicero et al., 2001; Cicero et al., 2003; Farkas et al., 2001; Monteagudo et al., 2003; Borenstein et al., 2007; Sonek et al., 2007a; Sonek et al., 2007b; Hoffman et al., 1995; Wren et al., 2000; Lindsey et al., 2014; Garrod et al., 1984; Esen et*

al., 1957; Rowe et al., 1961; Calderón et al., 2003; Robbins et al., 2007; Hyett et al., 1996; Roberts and Genest, 1992; Wolman et al., 2000; Perfumo et al., 2001; Bromley et al., 1995; Nyber et al., 2001; Dildy et al., 1996; Merati et al., 1996; Chaoui et al., 2008; Chaoui et al., 2005a; Zalel et al., 2008; Yagel et al., 2008; Borenstein et al., 2008; Rembouskos et al., 2012; Huggon et al., 2003; Faiola et al., 2005; Falcon et al., 2006; Kagan et al., 2009; Nicolaidis et al., 2004; Nicolaidis et al., 2004a, Maiz et al., 2009; Murta et al., 2002; Perfumo et al., 2005), y quizá su descripción pormenorizada no es el objeto de este trabajo. Todos los órganos y sistemas de la anatomía fetal y de los anejos ovulares pueden tener variaciones que aumenten el riesgo de que el feto sea portador de una anomalía cromosómica. La expresividad ecográfica de estas variaciones o marcadores es variable, existiendo algunos que son más específicos de etapas tempranas de la gestación y otros, que por el contrario, son visibles más tardíamente. No obstante, con la creciente capacidad de los ultrasonidos para detectar anomalías morfológicas, algunos marcadores que se consideraban hace unos años como exclusivos de la segunda mitad de la gestación, particularmente las malformaciones estructurales, hoy en día son detectables en el primer trimestre. Esto, en cierto modo, impide categorizar de forma taxativa a muchos marcadores ecográficos como exclusivos de un determinado momento de la gestación. Del mismo modo, y aun siendo cierto que existe una cierta correlación entre algunos marcadores ecográficos y determinadas anomalías cromosómicas (por ejemplo, canal aurículo-ventricular completo y trisomía 21), en general los marcadores ecográficos carecen de una vinculación fija con una determinada anomalía cromosómica y por ello la visualización de aquellos obliga siempre a un estudio completo del cariotipo.

En nuestra opinión, el único marcador que consideramos es merecedor de una descripción más detallada, dada la revolución que supuso en el diagnóstico prenatal de las cromosomopatías su introducción en la clínica, es la translucencia nual.

1.6.1 Translucencia nual

Las observaciones realizadas por Langdon Down en 1866, sobre individuos con retraso mental, determinaron la primera descripción fenotípica del síndrome que lleva su nombre. Este autor reflejó estos hallazgos con la siguiente descripción: *“La piel de estos individuos tiene un ligero tinte amarillento sucio, y es deficiente en la elasticidad, dando la apariencia de ser demasiado grande para el cuerpo, anormal coordinación neuromuscular, dificultades en el lenguaje oral, cara plana y ancha y mejillas redondeadas. Los ojos se colocan oblicuamente y los cantos internos son anormalmente distantes. La hendidura palpebral es muy estrecha y la frente está arrugada transversalmente. Los labios son grandes y gruesos con fisuras transversales. La lengua es larga y gruesa, y es muy áspera. La nariz es pequeña”*. Estos rasgos constituyeron, un siglo después, la base para el desarrollo de diferentes marcadores ecográficos, dentro de los cuales se encuentra el pliegue nual. Benacerraf et al. describieron la asociación entre un

engrosamiento de la zona nual fetal (pliegue nual) y la trisomía 21 en el segundo trimestre gestacional, reportando que el 40-50% de los fetos con esta cromosopatía muestran medidas del pliegue iguales o superiores a 6mm, con una tasa de falsos positivos del 0,1% (Benacerraf et al., 1985; 1987; 1992).

La anticipación al primer trimestre gestacional de la medición de este marcador permite una anticipación en la estimación del riesgo cromosómico y en su caso, la realización precoz del IVE. Nicolaidis et al., 1992 evaluaron el pliegue nual en esta etapa de la gestación midiendo el grosor de los tejidos blandos nuales e introdujeron el término “Translucencia nual” (TN) como la medición de un espacio sonoluscente o econeativo situado en la zona posterior de la nuca del feto, concluyendo que este exceso de líquido podía ser la consecuencia de la excesiva acumulación subcutánea de fluidos en la nuca fetal. Estos resultados y estudios posteriores realizados durante los siguientes 20 años, han permitido establecer que la medición del grosor de la TN proporciona una detección temprana y efectiva de las aneuploidías más graves (Snijders et al., 1998; Wald et al., 2003; Nicolaidis et al., 2004; Malone et al., 2005). El aumento de TN se refiere a una medición por encima del percentil 95 y el término se utiliza con independencia de si la colección de fluido está o no septada y de si es confinada al cuello o envuelve a la totalidad al feto.

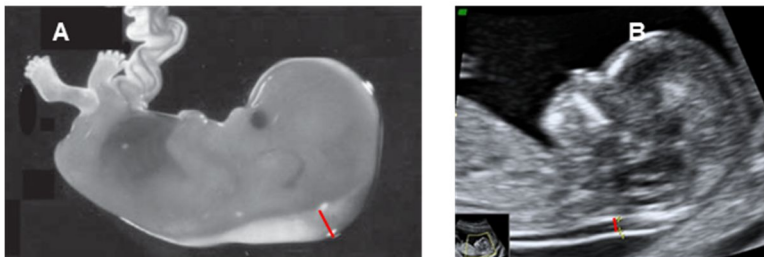


Figura 21. A) Feto de primer trimestre gestacional que muestra un acúmulo de fluido subcutáneo en la parte posterior del cuello. B) Medida de la translucencia nual en un feto a la 12ª semana de gestación.

Después de la 14ª semana gestacional, este acúmulo de fluido generalmente se resuelve, aunque en algunos casos evoluciona hacia engrosamiento nual o higroma quístico (Athena and Souka, 2005). El momento óptimo para la medición gestacional de la TN oscila entre la 11ª y 13+6 semana gestacional; si la medida de la TN es de 3.4 mm, la incidencia de cromosopatías se estima en 10,00%, mientras que tamaños entre 3,5-4,4 mm aumentan esta tasa hasta el 24,51% (Äyräs et al., 2013).

El aumento del grosor de la translucencia nual constituye también un importante marcador para la detección de cardiopatías, displasias esqueléticas y otros síndromes genéticos. Entre los posibles mecanismos de incremento de la TN se incluyen fallo cardiaco, congestión venosa de cabeza y cuello debido a compresión mediastínica, alteración de la composición de la matriz extracelular, retraso o anomalía en el desarrollo del sistema linfático,

fallo en el drenaje linfático secundario, anemia fetal o infección congénita (Hyett et al., 1996; Souka et al., 1998; Souka et al., 2005).

En fetos cromosómicamente normales, la prevalencia de muerte fetal aumenta exponencialmente con el grosor de la TN. Los análisis realizados en cohortes extensas de fetos con cariotipo normal y TN aumentada, informan de una prevalencia de aborto involuntario o muerte fetal entre 1,3-3% en aquellos con tamaños de TN entre los percentiles 95 y 99, (Souka et al., 1998, 2001; Michailidis et al., 2001) a aproximadamente 12,3-20% para medidas de TN iguales o superiores a 6,5 mm (Michailidis et al., 2001; Souka et al., 1998, 2001). La presencia de TN aumentada durante el primer trimestre de gestación también se asocia con síndromes genéticos, siendo los más prevalentes la hiperplasia adrenal, síndrome de DiGeorge, síndrome nefrítico y síndrome de Noonan (Athena et al., 2005).

En la Tabla 2 se resumen las tasas de detección para Síndrome de Down en función de los diferentes test bioquímicos disponibles, tanto de forma combinada con la edad materna como con diferentes marcadores ecográficos. Estos datos muestran que la combinación del cribado combinado del primer trimestre, evaluado conjuntamente con otros marcadores, proporciona una tasa de detección del 93-96% con un índice de falsos positivos del 2,5%. (Nicolaidis et al., 2011).

Método de screening	Rango de detección (%)	TFP (%)
Edad materna	30	5
Primer Trimestre		
Edad materna + Translucencia nucal (TN)	75-80	5
Edad materna + β -hCG libre+ PAPP-A	60-70	5
Edad materna + TN + β -hCG libre + PAPP-A (Test combinado)	85-95	5
Test combinado + Hueso nasal o RT o DV	93-96	2,5
Segundo Trimestre		
Edad materna + AFP + β -hCG libre (Doble test)	60-65	5
Edad materna + AFP + β -hCG libre + uE3 (Triple test)	65-70	5
Edad materna + AFP + β -hCG libre + uE3 + Inhibina A (Cuadruple test)	70-75	5
Edad materna + TN + PAPP-A (11-13 sg)+ Cuadruple test	90-94	5

Tabla 2. Rendimiento de los diferentes métodos para el cribado de la trisomía 21.

El cribado prenatal para la detección de trisomía 21 y 18, es un proceso dinámico con una constante búsqueda de nuevas combinaciones de marcadores que mejoren la sensibilidad de los test de cribado y/o disminuyan la tasa de falsos positivos. Así, un estudio a gran escala publicado en 2014 establece una disminución en la tasa de falsos positivos (2%) cuando se excluye la edad materna del algoritmo para el cribado (Engels et al., 2014), mientras que Abele

et al., 2015 refieren una sensibilidad semejante a la reportada por *Nicolaides et al.*, 2011 con tasa de falsos positivos del 4%, utilizando como criterio de selección la combinación de edad materna junto a la incorporación de un mayor número de marcadores ecográficos.

2.- OBJETIVOS

1. Describir la evolución y tendencias en los criterios establecidos para selección de gestantes en riesgo de cromosomopatía fetal durante un periodo de 25 años.
2. Analizar la incidencia de las diferentes categorías de alteraciones cromosómicas en cada uno de los criterios para realizar amniocentesis.
3. Establecer el Valor Predictivo Positivo para la detección de cromosomopatías de las distintas indicaciones incluidas en los protocolos de Diagnóstico Prenatal.
4. Determinar las frecuencias de Alteraciones numéricas y Reordenamientos cromosómicos estructurales en gestantes en las que la única indicación para el estudio del cariotipo fetal era la edad materna avanzada.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el periodo 1989-2013 se realizaron 11.942 cariotipos procedentes de cultivos de líquido amniótico obtenidos mediante amniocentesis. El 95% de las muestras fueron remitidas al Servicio de Genética del Hospital Universitario 12 de Octubre desde el Servicio de Ginecología y Obstetricia del mismo centro, mientras que el 5% restante fueron remitidas desde de otros hospitales.

Criterios de inclusión

Los criterios para realizar amniocentesis se recogen en la tabla 3, junto a las abreviaturas que hemos utilizado en el trabajo para su descripción.

Indicación	
Edad materna avanzada (≥ 35 años)	EMA
Marcador y/o malformación ecográfica	ME
Cribado combinado 1º trimestre	CC1
Ansiedad materna	AM
Hijo anterior con cromosopatía <i>de novo</i>	HCN
Malformación congénita previa	MCP
Screening bioquímico del 2º trimestre en suero materno	SB
Pareja portadora reordenamiento cromosómico	PPR
Gestante con historia de abortos	HA

Tabla 3. Se representan los 9 criterios considerados en este trabajo para la selección de gestantes en riesgo de cromosopatía fetal.

Criterios de exclusión

Gestantes con indicación fuera de los criterios descritos anteriormente para realizar Diagnóstico Prenatal Citogenético (DPC), tales como estudio enfermedades monogénicas y confirmación de resultados obtenidos mediante biopsia corial.

No se han incluido en el análisis aquellas amniocentesis en las cuales no se obtuvo resultado citogenético, evaluando por tanto en este trabajo un total de 11523 cariotipos fetales. Además se han realizado 328 cariotipos en sangre periférica de los padres para completar el estudio prenatal en los casos requeridos.

Criterios éticos y legales

Las gestantes candidatas a prueba invasiva, tanto para realizar amniocentesis como biopsia corial, fueron informadas en la Consulta de Genética de las características del estudio y de los riesgos asociados de forma previa a la obtención de la muestra, de manera que la pareja optara por uno de los dos métodos invasivos de manera informada. Además se recogieron los

datos demográficos y clínicos, así como el árbol genealógico familiar de tres generaciones, incluida la gestación a estudio. Se revisaron las bases de datos existentes, completando en su caso los datos necesarios y las historias clínicas de aquellas gestantes no incluidas en los registros digitalizados.

Se solicitó a todas las gestantes o a sus padres/tutores consentimiento informado escrito para la toma de muestra de líquido amniótico tal y como requiere la Ley Básica que regula la Autonomía de Paciente y de Derechos y Obligaciones en materia de información y documentación clínica (Ley 41/2002, de 14 de noviembre).

Dado que el periodo de estudio es muy amplio, hemos incluido un cronograma en el que se representa la etapa de incorporación de las diferentes metodologías utilizadas para realizar los estudios citogenéticos prenatales.

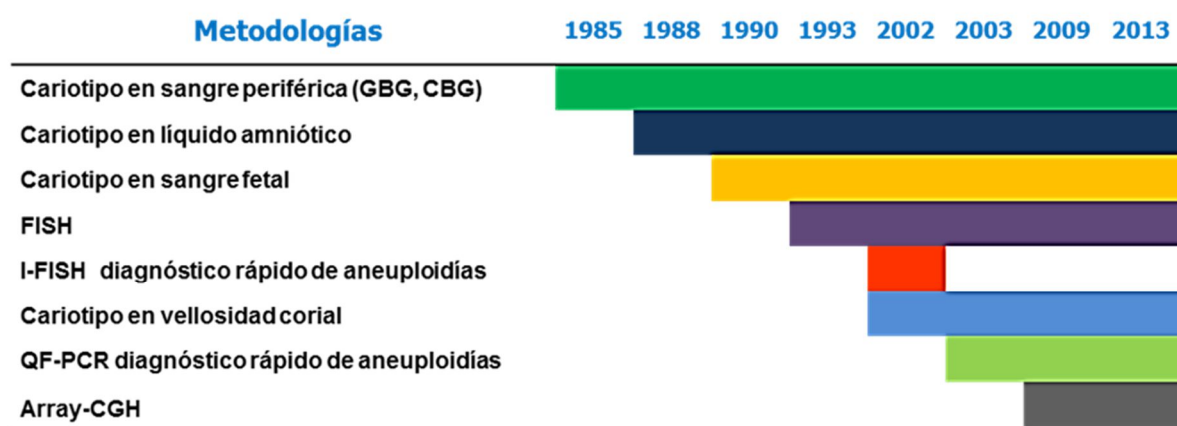


Tabla 4. Cronograma que muestra la incorporación a la práctica citogenética de las diferentes metodologías utilizadas.

Las anomalías cromosómicas estructurales (RCEs) se han clasificado en equilibradas y desequilibradas en base al análisis con técnicas de citogenética convencional.

Hemos considerado RCEs con posible repercusión fenotípica a aquellos con desequilibrio de dosis, los cuales incluyen deleciones, duplicaciones, derivados de translocación, isocromosomas, cromosomas marcadores y cromosomas en anillo, además de los reordenamientos cuyo origen ha sido *de novo*.

En la categoría "Inversión" no se han incluido las variantes heterocromáticas pericentroméricas correspondientes a los cromosomas 1, 9 y 16 junto a las variaciones de la región Yq12, así como los alargamientos de los brazos p de los cromosomas acrocéntricos, identificados ambos como un heteromorfismo sin repercusión clínica.

3.1- Recogida de las muestras

3.1.1 Líquido amniótico

La obtención de líquido amniótico se ha realizado de manera ambulatoria en la Sección de Medicina Fetal (Servicio de Ginecología y Obstetricia) por profesionales entrenados para la realización de técnicas invasivas.

La amniocentesis comienza por una exploración ecográfica para valorar la viabilidad del feto, su biometría, la localización placentaria y las lagunas mayores de líquido amniótico (LA) más accesibles. Tras decidir la trayectoria que ha de llevar la aguja se desinfecta la zona elegida del abdomen y se procede a la punción. Se realiza con una aguja del calibre 20 ó 22 G bajo control ecográfico continuo. Cuanto más precoz es la amniocentesis mayor es la posibilidad de tener que atravesar el espacio celómico y las membranas del corion y amnios no fusionadas, lo cual dificulta la llegada a la cavidad amniótica; la punta de la aguja rechaza el amnios sin perforarle. Una vez introducida la aguja en la cavidad amniótica se adapta una jeringa a la aguja y se extrae el LA en cantidad aproximadamente de 1 cc por semana de gestación (entre el 10%-15% del volumen total de LA). No está demostrado que desechar el primer mililitro de LA reduzca la tasa de contaminaciones maternas de la muestra, pero sí existe relación entre esta complicación y la experiencia del operador (*Welch et al., 2006*). La tasa de éxito en la obtención de la muestra se aproxima al 100% cuando se realiza por manos experimentadas

El volumen de LA obtenido (aproximadamente 15 ml) se recoge en tubo con fondo cónico y faldón, el cual es etiquetado e identificado incluyendo nombre de la gestante y número de Historia clínica. Las muestras son enviadas mediante circuito establecido al Servicio de Genética para ser registradas y procesadas. El transporte debe realizarse protegido de la luz y a temperatura ambiente, nunca en nevera, ya que temperaturas extremas perjudican seriamente la viabilidad del cultivo.

A partir del volumen inicial se realizan 3 alícuotas: una de ellas destinada a realizar diagnóstico rápido de aneuploidías y las 2 restantes para establecer dos cultivos primarios. Este proceso se realiza bajo condiciones estériles (campana de flujo y material estéril desechable).

3.1.2 Sangre periférica

Las muestras de sangre periférica se obtienen por venopunción habitualmente en la región cubital del brazo, requiriéndose un volumen aproximado de 5 ml, los cuales son recogidos en tubos comercializados que contienen heparina de litio al 1% (la heparina ejerce su acción anticoagulante impidiendo así la activación de los mecanismos de coagulación). Para su optimización la siembra se debe realizar durante las 2 horas siguientes a la extracción. Esta muestra se puede conservar a 4°C durante 48 h.

3.2 Técnicas de cultivo celular

Los estudios citogenéticos convencionales junto con algunas técnicas de FISH, requieren la presencia de células en división. Únicamente durante esta etapa del ciclo celular y específicamente en metafase, los cromosomas pueden ser identificados individualmente al microscopio. Los cromosomas metafásicos se pueden obtener *in vivo*, a partir de muestras que presentan un alto índice mitótico (vellosidad corial, médula ósea y tumores sólidos, entre otros) o *in vitro* induciendo la división celular mediante agentes químicos (linfocitos de sangre periférica, biopsias de tejido y células de líquido amniótico) mediante el establecimiento de cultivos celulares. Este procedimiento se lleva a cabo en condiciones estériles con el objetivo de prevenir posibles contaminaciones que pudiesen afectar la viabilidad celular.

3.2.1 Cultivo de sangre periférica

3.2.1.1 Cultivo estandar

Añadir 0,6 ml de sangre completa en un tubo cónico que contiene 5 ml de medio de cultivo HAM-F10 (*Gibco Invitrogen*). El medio de cultivo se suplementa con: 20% Suero Bovino Fetal (*Gibco Invitrogen*), 2% L-Glutamina (*Gibco Invitrogen*), 2% Penicilina/Estreptomina (100U/ml) (*Gibco Invitrogen*), Hepes (Solución salina tamponada para el mantenimiento del pH entre 7,2-7,4) (*Gibco Invitrogen*) y 4% Fitohemaglutinina (PHA) (10µgr/ml), mitógeno que estimula la proliferación de linfocitos T (*Gibco Invitrogen*).

- Incubar en estufa a 37° C sin CO₂, manteniendo el tubo inclinado hasta alcanzar el pico máximo de crecimiento celular (72 horas tras la siembra).
- Añadir a 0,1 ml de Colcemid (10 µg/ml) (*Euroclone*) e incubar durante 30 minutos a 37° C. Este antimitótico, análogo de la Colchicina, se ensambla a la tubulina que forma parte del huso mitótico, impidiendo su despolimerización. De este modo, se impide la separación de las cromátidas hermanas en anafase, quedando las células bloqueadas en el estadio de metafase.
- Centrifugar a 1.800 rpm durante 8 minutos y decantar sobrenadante.
- Añadir 7 ml de choque hipotónico solución de Cloruro Potásico (KCl 0,075M) y dejar actuar durante 20 minutos en baño María a 37° C. Esta solución hipotónica, al contener una menor concentración de sales que el citoplasma celular, provoca la entrada de agua en la célula mediante ósmosis, haciendo que ésta se hinche. Se considera que el choque hipotónico es un paso crítico del cual depende posteriormente la obtención de extensiones cromosómicas de calidad.
- Centrifugar a 1.800 rpm durante 8 minutos, decantar sobrenadante.
- Añadir solución Carnoy (metanol-ácido acético en proporción 3:1). Esta solución se añade inicialmente gota a gota, por la pared del tubo y posteriormente en agitación

haciendo uso de un rotor hasta alcanzar los 8 ml/tubo. De este modo se consigue detener la acción de la solución hipotónica y fijar las células. El metanol precipita la cromatina y el ácido acético lisa las distintas estructuras membranosas de la célula sin precipitarlas.

- Centrifugar a 1.600 rpm durante 6 minutos. Decantar sobrenadante.
- Añadir 5 ml de fijador Carnoy. Resuspender.
- Centrifugar 6 min a 1.600 rpm.
- Añadir 5 ml de solución Carnoy. Resuspender.
- Centrifugar 6 min a 1.600 rpm.
- Decantar sobrenadante y resuspender el botón celular de forma manual. De este modo puede conservarse el material fijado a 4° C hasta el momento de realizar la extensión.
- Realizar la extensión celular sobre un portaobjetos, previamente desengrasado en metanol al 70%. Una buena extensión debe tener un número suficiente de metafases con el menor número de solapamientos posibles y libres de citoplasma.

Existen numerosas variantes que afectan a la obtención de buenas extensiones, entre ellas: temperatura ambiente, humedad y el propio tratamiento hipotónico. Temperaturas altas y humedad favorecen la obtención de buenas preparaciones. Otras variables son la altura desde la que se realiza la extensión y el uso de portaobjetos humedecidos con agua destilada. El material fijado sobrante se puede conservar a -20°C durante 5-6 años.

3.2.1.2 Cultivo de alta resolución

De manera rutinaria, los cromosomas se analizan en el estadio de metafase, situación en la que dicho material alcanza el máximo grado de condensación. Aunque la resolución obtenida (400-500 bandas) es suficiente, puede ocurrir que pequeñas anomalías estructurales pasen inadvertidas. Por ello en ocasiones es necesario obtener cromosomas más largos, menos condensados, conocidos como prometafásicos (alcanzan una resolución de aproximadamente 850 bandas).

La obtención de cromosomas prometafásicos se lleva a cabo mediante sincronización celular realizando una modificación respecto al cultivo estándar, que incluye la adición de un reactivo intercalador del DNA (Bromuro de etidio; BE) para la obtención de cromosomas prometafásicos (*Misawa et al., 1986*). Para su realización se procede a la siembra de la muestra según apartado 3.2.1.1, incorporando 0,10 ml del BE (1 mg/ml) (*Sigma Aldrich*) a la vez que se añade el Colcemid, incubando en estufa sin CO₂ a 37° C durante 1 h. A continuación se reanuda el procedimiento de manera semejante al cultivo estándar.

3.2.2 Cultivo de líquido amniótico

El estudio del cariotipo convencional con bandas G se ha realizado siguiendo los protocolos de citogenética prenatal reconocidos por la EQA (*European Quality Assurance; Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance*).

En el laboratorio se reciben de manera estandarizada una media de 15 ml. de LA por amniocentesis realizada, utilizando 10 ml para establecer 2 cultivos primarios según el siguiente protocolo:

- Rotular convenientemente los dos tubos con el nº de muestra, fecha e identificación del tubo.
- Centrifugar a 1.300 rpm durante 10 minutos.
- Decantar y dejar 0,5 ml.
- Establecer dos cultivos utilizando reactivos de dos casas comerciales diferentes. Añadir 1,5 ml de medio de cultivo completo a cada tubo *Nunclon™Δ Surface (NUNC)*. Medio A: HAM-F10 (*Gibco Life Technology*), suplementado con 30% de suero bovino fetal y 2,7% de Ultrosor G (*Genycell*), 1,5 ml de HEPES 1M (*Gibco Life Technology*), 0,75 ml de Penicilina-Estreptomicina (*Gibco Life Technology*) y 1 ml de L- Glutamina 200mM (*Gibco Life Technology*), previamente atemperado a 37°C. Medio B: los mismos reactivos y cantidades (*Genycell*).
- Incubar en estufa a 37°C durante 5 días y cambiar el medio.
- A partir del séptimo día, visualizar la proliferación celular mediante microscopio invertido de manera diaria.
- Cambiar el medio a los siguientes 3 días de incubación.
- Cuando se observa la formación de una monocapa celular, eliminar el medio de cultivo y tripsinizar (levantar las células). Se realiza un lavado con 1 ml de Tripsina-EDTA 0,5%/ 0,02% (*Genycell*) (proteasa que se encarga de romper las uniones intercelulares). Añadir 1,5 ml e incubar 2 min a 37° C, visualizar al microscopio para comprobar que las células se han individualizado. Transferir la mitad del volumen a un nuevo tubo y detener la acción de la tripsina añadiendo 1,5 ml de medio de cultivo.
- Incubar a 37°C durante 24 horas.
- Visualizar al día siguiente y cambiar medio.
- En las siguientes 24 horas, añadir 0,3 ml de Colcemid 10 µg/ml (*Euroclone*) a los dos tubos e incubar a 37° C durante 90 min.
- Realizar estos cuatro últimos pasos con el cultivo complementario, 24 horas después.
- Centrifugar 5 min a 1.500 rpm y retirar sobrenadante.
- Resuspender el botón celular y añadir 7 ml de solución hipotónica (KCl 0,075M), incubando los tubos a 37° C en baño durante 18 minutos.
- Añadir 5 gotas de fijador Carnoy y resuspender.

- Centrifugar 5 min a 1.500 rpm.
- Retirar sobrenadante, resuspender y añadir 5 ml de fijador Carnoy. Resuspender.
- Centrifugar 5 min a 1.500 rpm.
- Retirar sobrenadante, resuspender y añadir 5 ml de fijador Carnoy. Resuspender.
- Centrifugar 5 min a 1.500 rpm.
- Retirar el sobrenadante, resuspender y añadir 5 ml de fijador Carnoy. Agitar en vortex.
- Centrifugar 5 min a 1.000 rpm y decantar de nuevo el sobrenadante. Fijar la suspensión celular con Carnoy, añadiendo el fijador al principio gota a gota por la pared del tubo y posteriormente de forma continua, enrasando a 8 ml. Centrifugar, decantar y repetir el proceso de fijación tres veces más, añadiendo 1 ml menos de Carnoy en cada lavado. En el último lavado se decanta y resuspende el botón manualmente, añadiendo 2-3 ml de Carnoy. De este modo puede conservarse el material fijado a 4°C hasta el momento de realizar la extensión.
- Realizar extensión celular sobre un portaobjetos previamente desengrasado en metanol al 70%. El material fijado sobrante se puede conservar a -20° C durante 5-6 años.

3.3 Bando cromosómico

3.3.1 Bandas G

La técnica se inicia a partir de extensiones previamente envejecidas en estufa a 37°C.

- Introducir los portaobjetos en una solución de ácido clorhídrico (ClH) al 30% a temperatura ambiente durante 10 min.
- Lavar con agua.
- Introducir los portaobjetos durante 1 min en una solución de 2xSSC (8,82 gr de Citrato sódico (*Sigma*), 17,53 gr de NaCl 0,3M (*Sigma*) y 1 litro de agua destilada) a 65°C. Este paso permite que se abra la hebra de ADN.
- Lavar el portaobjetos con agua y secar al aire.
- Teñir con solución de tinción Wright.

Nota: La solución de tinción consta de 1ml de colorante Wright [2,5 gr de colorante Wright (*Sigma*) y 1 litro de metanol], 1,5 ml de tampón Sörensen pH 6,8 [5,93 gr de NaH₃PO₄ (*Sigma*), 4,53 gr de KH₂PO₄ (*Merck*) y 1 litro de agua destilada] y 1,5 ml de tampón pH 6,8 (*CARLO ERBA*).

- Lavar con agua y se dejan secar.

Los tiempos de tinción se establecen en función del tipo de muestra y de las condiciones particulares de cada laboratorio.

3.3.2 Bandas C

- Introducir los portaobjetos en una cubeta con HCl 0,02N (2 ml HCl y 100 ml de agua destilada) a temperatura ambiente durante 10 min.
- Lavar con agua y se deja secar al aire.
- Introducir los portaobjetos en una cubeta a 60°C con Hidróxido bórico [Ba(OH)₂] saturado (304 gr de Ba(OH)₂ y 100 ml de H₂O) durante 1 min. El hidróxido bórico depuriniza y desnaturaliza el ADN. La heterocromatina constitutiva resiste a la degradación y es por tanto el único material que queda teñido.
- Realizar dos lavados con agua destilada y metanol para eliminar los restos de bario.
- Dejar secar.
- Incubar en una solución de 2xSSC a 65° durante 15 min.
- Lavar con agua y se dejan secar.
- Teñir con solución de tinción Wright durante 5 min.
- Lavar con agua y dejar secar.

3.3.3 Tinción Ag-NOR

- Preparar una solución de nitrato de plata al 50% (0,5 gr AgNO₃ y 1 ml de agua destilada). Filtrar.
- Añadir 0,2 µl de esta solución sobre el portaobjetos.
- Añadir 6-8 gotas de una solución de formaldehído al 0,3% en agua destilada.
- Incubar durante 24 h a 37° C protegido de la luz.

Este protocolo fue utilizado en nuestro laboratorio para identificar las regiones NOR durante 15 años, siendo sustituido por la técnica FISH Acro-p con el mismo fin, la cual se describe en el apartado de protocolos para Hibridación in situ fluorescente.

3.4 Análisis al microscopio

Para la realización del cariotipo, se analizaron al menos 10 metafases de cada tubo de cultivo mediante microscopía óptica (*Nikon Labophot*). Se digitalizaron al menos 1 metafase procedente de cada cultivo mediante el sistema de captura de imágenes para microscopia Cytovision Ultra v3.9 (*Applied Imaging*). La fórmula cromosómica se describió de acuerdo al International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN), en sus diferentes ediciones.

3.5 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

En este trabajo se ha utilizado la técnica FISH tanto en cromosomas metafásicos como en núcleos interfásicos, en función del diagnóstico requerido en cada ocasión. En el caso de estudio en metafase, no es necesario realizar ningún procedimiento adicional al convencional para la preparación de las extensiones. Sin embargo, en los estudios en núcleos en interfase

se requiere un tratamiento previo de las células amnióticas. Desde el año 1996 hasta el año 2004 se utilizó esta metodología para el diagnóstico rápido de aneuploidías de los cromosomas X, Y, 13, 18 y 21 en núcleos en interfase de líquido amniótico.

3.5.1 Preparación de extensiones para análisis de núcleos en interfase

- Recoger 5 ml de líquido amniótico en tubo de plástico con fondo cónico.
- Centrifugar a 1.000 rpm durante 10 min, retirar el sobrenadante hasta un volumen de 0,5 ml y resuspender.
- A continuación se añaden 3 ml de ácido cítrico al 1% y se resuspende nuevamente.
- Añadir 0,25 ml de Tween 20 (*Sigma*), resuspender e incubar a 37°C con agitación durante 30 min.
- Centrifugar a 1.000 rpm durante 10 min, retirar el sobrenadante hasta un volumen de 0,5 ml y volver a resuspender sin dejar grumos.
- Añadir 0,4 ml de fijador Carnoy frío y resuspender hasta que las dos fases queden bien mezcladas.
- Centrifugar a 1.000 rpm durante 10 min, retirar el sobrenadante hasta un volumen de 0,5 ml.
- Decantar el sobrenadante hasta 0,3 ml y resuspender.
- Realizar las extensiones en portaobjetos añadiendo dos gotas de ácido acético al 45% y dos gotas de la muestra.
- Valorar al microscopio de contraste de fases la calidad y cantidad de núcleos presente en la extensión. Si es adecuada, se puede guardar el pellet sobrante a 4°C.
- Almacenar las extensiones a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización.

3.5.2 Hibridación con sondas de secuencia única (LSI)

Este protocolo se ha utilizado para las sondas 13q14 y 21q22 incluidas en el diagnóstico rápido de aneuploidías (*CytoCell*), así como para las sondas de síndromes de microdelección (*Vysis, Abbot Molecular*) y sondas subteloméricas (*Vysis, Abbot Molecular*), tanto en metafases como en núcleos en interfase. El tamaño de estas sondas oscila entre 1Kb y 1Mb.

Pretratamiento de los portaobjetos

- Poner en una solución de 2xSSC (pH 7,4) a 37° C durante 30 min.
- Deshidratar en serie de etanol al 70%, 80% y 95% a temperatura ambiente 2 min. en cada uno. Dejar secar.

Pretratamiento de la mezcla de hibridación

- Precalentar a temperatura ambiente el vial con la mezcla de sondas LSI 13 (13q14) marcada con fluorocromo Spectrum Green y LSI 21 (21q22.13-q22.2) marcada con fluorocromo Spectrum Orange (*CytoCell*).

- Precalentar el portaobjetos a hibridar a temperatura ambiente.

Hibridación

- Añadir 10 µl de la sonda en el portaobjetos.
- Poner cubreobjetos 24x60 mm y sellar con pegamento.
- Colocar la preparación en hibridador Hybrite (*Vysis, Abbott Molecular*) con un programa de desnaturalización de 75° C durante 2 min e hibridación a 37° C toda la noche.

Lavados post-hibridación

- Retirar con cuidado el pegamento y el cubreobjetos.
- Lavar la preparación en una solución 0,4xSSC a 72° C durante 2 min.
- Lavar la preparación en una solución 2xSSC/0,05% Tween 20 a temperatura ambiente durante 30 sg.
- Dejar secar y añadir 10 µl de contratinción DAPI II [125 ng 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) /ml *antifade*] (*Vysis, Abbott Molecular*).
- Conservar a 4°C hasta su análisis.
- Visualizar las señales con microscopio de fluorescencia equipado con filtros correspondientes (*Olympus*) y digitalizar mediante sistema de captura de imágenes para microscopía *MetaSystem* (*Abbott Molecular*). Para la determinación del estado de ploidía de los cromosomas 13 y 21, se estableció un mínimo de 50 núcleos para la determinación de las señales correspondientes a cada par cromosómico. Se consideró como informativo el número de señales presente en un porcentaje superior al 42%, como no informativo el número de señales inferior al 23% y como indeterminado el rango comprendido entre el 23% y el 42%. En el caso de análisis en metafase se deben visualizar un mínimo de 15 metafases.

Nota. El protocolo para realizar hibridación con sondas subteloméricas es similar al descrito con una única variación en la preparación de la mezcla de hibridación, que se describe a continuación.

- Premezclar 1 µl de la sonda telomérica (*Vysis, Abbot Molecular*) junto con 7 µl de buffer específico de la sonda y 2 µl de agua destilada. Resuspender la mezcla, precalentar a 37°C y añadir al portaobjetos.

3.5.3 Hibridación con sondas centroméricas y/o alfoides

Este protocolo se ha utilizado para las sondas DXZ1 y DYZ1 (*Cytocell*), y D18Z1 (*Vysis, Abbott Molecular*) incluidas en el diagnóstico rápido de aneuploidías. También ha sido utilizado para aquellas sondas centroméricas que se han necesitado para definir patologías cromosómicas detectadas en el análisis del cariotipo (*Vysis, Abbott Molecular*), tanto en cromosomas metafásicos como en núcleos en interfase.

Nota. El protocolo utilizado para estas sondas es similar al descrito en el punto 3.5.2, con la salvedad de la preparación de la mezcla de hibridación, la cual se describe a continuación.

- Mezclar 5 µl de la sonda *cocktail XY* (SprectumGreen/ SpectrumOrange (LPE0XY, *Cytocell*) y 5 µl sonda CEP18 (SpectrumAcqua) (*Vysis, Abbott Molecular*).
- Resuspender la mezcla, precalentar a 37°C y añadir al portaobjetos.

3.5.4 Hibridación con sondas painting

Estas sondas permiten detectar fundamentalmente translocaciones, material adicional intracromosómico y cromosomas marcadores. Su aplicación es efectiva únicamente en metafases. En este trabajo hemos utilizado sondas painting comercializadas *Vysis, Abbott Molecular*. El protocolo para su utilización ha sido similar al descrito en el punto 3.5.2.

3.5.5 Hibridación con sondas Acro-p

Estas sondas se han utilizado para descartar cromosomopatías localizadas a los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos, mediante la identificación de regiones NOR. Esta sonda (*Acro-p, Cytocell*), sustituyó en el año 2004 a la técnica Ag-NOR. El protocolo para su uso es similar al descrito en el punto 3.5.2, con la salvedad de la cantidad de sonda utilizada.

- Añadir al portaobjetos 10 µl de sonda Acro-p.

3.6 PCR cuantitativa fluorescente (QF-PCR)

Esta metodología se ha empleado a partir del año 2004 para el diagnóstico rápido de las aneuploidías que afectan a los cromosomas X, Y, 13, 18 y 21, sustituyendo a partir de ese momento a las técnicas de hibridación *in situ* fluorescente utilizadas para este fin. Se aplicó esta técnica en todas las muestras de líquido amniótico desde el momento de su implementación.

3.6.1 Extracción de ADN

Se realizó extracción de ADN a partir de 5 ml de líquido amniótico según el siguiente protocolo (*QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen*):

- Centrifugar a 3000 rpm durante 10 min.
- Decantar el sobrenadante hasta un volumen de 0,5 ml y resuspender
- Pasar a un eppendorf de 0,5 ml.
- Centrifugar a 8.000 rpm durante 5 min.
- Decantar el sobrenadante hasta dejar el pellet seco.
- Pipetear 20 µl de Proteinasa K y añadir a la muestra.
- Añadir 200 µl de Buffer AL. Vortez 15 sg.

- Incubar a 56°C durante 10 min.
- Pulso de centrifuga.
- Añadir 200 µl de etanol. Vortex 15 sg.
- Poner en una columna sin mojar el tapón y centrifugar a 8.000 rpm durante 1 min.
- Poner la columna en un tubo limpio.
- Abrir con cuidado la columna y añadir 500 µl de Buffer AW1.
- Cerrar la tapa y centrifugar a 8.000 rpm durante 1 min.
- Poner la columna en otro tubo limpio.
- Abrir con cuidado la columna y añadir 500 µl de Buffer AW2.
- Cerrar la tapa y centrifugar a 14.000 rpm durante 3 min.
- Poner la columna en un tubo de 1,5 ml. Abrir la columna y añadir 50 µl de Buffer AE.
- Incubar a temperatura ambiente durante 5 min y centrifugar a 8.000 rpm durante 1 min.
- Resuspender y pasar a un eppendorf de 1,5 ml.
- Guardar en congelador a -20°C hasta su utilización.

3.6.2 Mezclas de reacción y amplificación

Se diseñaron dos PCRs múltiples (M1 y M2) que incluían 14 marcadores microsatélites (STRs), 3 para los cromosomas 13, 18 y 21 y cinco para el par sexual. Los STRs se distribuyeron en dos tubos, de manera que todos los cromosomas estuvieran representados en las dos mezclas de reacción. Se consideró que estos microsatélites debían tener una heterocigosidad mínima de 0,65 con unidades de repetición tetra o pentanucleotídicos.

Se rotulan los tubos de reacción para cada muestra analizar como M1 y M2 junto al número de caso. Se han incluido controles sin ADN en todas las reacciones. En la Tabla 5 se incluyen los reactivos utilizado para cada multiplex y las cantidades correspondientes.

En la Tabla 6 se representan los diferentes microsatélites utilizados, así como su localización cromosómica junto a otras características de estos marcadores (heterocigosidad, tamaño en pb, secuencia del *primer* y rango alélico. Cada *primers* se reconstituye con 333 µl de agua MilliQ (*Invitrogen Corporation*) para alcanzar una concentración final de 10 nM.

Reactivos		MULTIPLEX 1	MULTIPLEX 2		
Agua MilliQ	(Invitrogen Corporation)	3,2 µl	0,8 µl		
1x AmpliTaq Gold Polymerase Buffer (2mM MgCl ₂)	(Applied Biosystems)	1,5 µl	1,5 µl		
dNTPs 20mM	(Invitrogen Corporation)	0,3 µl	0,3 µl		
Primer F	(Applied Biosystems)	D21S1435	0,1 µl	HPRTB	0,15 µl
		D13S258	0,04 µl	D21S1411	0,3 µl
		AMXY-M	0,06 µl	D21S11	0,4 µl
		X22	1,2 µl	D18S535	0,3 µl
		D18S51	0,1 µl	D18S386	0,4 µl
		D13S628	0,04 µl	DXS6803	0,3 µl
				D13S634	0,8 µl
		SRY	0,5 µl		
Primer R	(Applied Biosystems)	D21S1435	0,1 µl	HPRTB	0,15 µl
		D13S258	0,04 µl	D21S1411	0,3 µl
		AMXY-M	0,06 µl	D21S11	0,4 µl
		X22	1,2 µl	D18S535	0,3 µl
		D18S51	0,1 µl	D18S386	0,4 µl
		D13S628	0,04 µl	DXS6803	0,3 µl
				D13S634	0,8 µl
		SRY	0,5 µl		
AmpliTaq Gold Polymerase	(Applied Biosystems)	1,5 µl	1,5 µl		
DNA genómico		4 µl	4 µl		

Tabla 5. Reactivos utilizados para las mezclas de reacción correspondientes a la Multiplex 1 y Multiplex 2.

Marcador	Localización cromosómica	Heterozigosidad	5' marcaje	Rango alélico (pb)	Secuencia
MULTIPLEX 1					
AMXY	Xp22-Yp11	ND	6-FAM	X-104 Y-110	F5'-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG-3' R5'-ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG-3'
X22	Xq/Yq	0,87	6-FAM	192-247	F5'-TAATGAGAGTTGGAAAGAAA-3' R5'-CCCATTGTTGCTACTTGAGA-3'
D13S258	13q21-q31	0,93	VIC	206-282	F5'-ACCTGCCAAATTTTACCAGG-3' R5'-GACAGAGAGAGGGAATAAACC-3'
D13S628	13q31.1	0,70	NED	425-470	F5'-TAACATTCATTGTCCCTTACAGAT-3' R5'-GCAAGGCTATCTACGATAATTCA-3'
D18S51	18q21.33	0,87	PET	268-320	F5'-GAGCCATGTTTCATGCCACTG-3' R5'-CAAACCCGACTACCAGCAAC-3'
D21S1435	21q21.3	0,90	VIC	160-200	F5'-CCCTCTCAATTGTTTGTCTACC-3' R5'-ACAAAAGGAAAGCAAGAGATTTCA-3'
MULTIPLEX 2					
HPRTB	Xq26	0,78	6-FAM	262-300	5'-ATGCCACAGATAATACACATCCCC-3' (AGAT strand) 5'- CTCTCCAGAATAGTTAGATGTAGGTAT-3' (TCTA strand)
DXS6803	Xpter-Xqter	0,75	VIC	100-130	F5'-GAAATGTGCTTTGACAGGAA-3' R5'-CAAAAAGGGACATATGCTACTT-3'
SRY	Yp11.3	ND	6-FAM	463	F5'-GAATATTCCTCCGCTCTCCGGA-3' R5'-GCTGCTGCTCCATTCTTGAG-3'
D13S634	13q14.3-22	0,81	PET	385-440	F5'-GGCAGATTCAATAGGATAAATAGA-3' R5'-GTAACCCCTCAGGTTCTCAAGTCT-3'
D18S386	18q22.1	0,88	NED	315-387	F5'-TCAGGAGAATCACTTGGAAC-3' R5'-TCCATGAAGTAGCTAAGCAG-3'
D18S535	18q12.2-12.3	0,92	PET	128-159	F5'-TCATGTGACAAAAGCCACAC-3' R5'-AGACAGAATATAGATGAGAATGCA-3'
D21S11	21q21	0,93	PET	207-247	F5'-TATGTGAGTCAATTCCTCAAGTGA-3' R5'-GTTGTATTAGTCAATGTTCTCCAG-3'
D21S1411	21q22.3	0,93	NED	258-322	F5'-ATGATGAATGCATAGATGGATG-3' R5'-AATGTGTGTCCTTCCAGGCG-3'

Tabla 6. Marcadores utilizados en las Multiplex 1 y Multiplex 2 en los análisis de rutina. Los fluorocromos utilizados han sido FAM (azul), VIC (verde), NED (negro), y PET (rojo).

Una vez preparadas las mezclas de reacción, se realiza una desnaturalización a 95°C durante 2 min. A continuación se realizan 26 ciclos de amplificación a 94° durante 35 sg, 58° C durante 35 sg y 72°C durante 40 sg. La reacción finaliza con un ciclo a 72°C durante 15 min (extensión final).

3.6.3 Análisis de los fragmentos e interpretación de los resultados

Los pasos para realizar el análisis se describen a continuación:

- Mezclar 2 µl de los productos de PCR con 24 µl de formamida ultra pura desionizada y 0,5 µl de marcador de peso molecular (GeneScan 500 LIZ Standard, *Applied Biosystems*).
- Desnaturalizar a 95°C durante 3 min.
- En una placa multipocillo, añadir 12,5 µl de la mezcla desnaturalizada.
- Introducir la placa en secuenciador automático ABIPrism 3100 Avant (*Applied Biosystems*).

Los resultados se analizaron con la aplicación GeneMapper v4.0 (*Applied Biosystems*). Para su interpretación se obtuvo el ratio entre alelos dividiendo el valor de área correspondiente al pico más pequeño (en pb) por el área del pico más elevado. Se consideró un rango normal para este cociente entre 0,8-1,6, estableciendo como patológicos los ratios 1:1:1 correspondientes a patrones trialélicos y 1:2 o 2:1 en patrones dialélicos.

Hemos establecido un resultado informativo para un determinado cromosoma, cuando al menos uno de los alelos ha mostrado un patrón heterocigoto con ratio normal. Para las muestras patológicas, al menos dos marcadores han debido que presentar un patrón patológico. Los resultados de un electroferograma estándar para una muestra con resultados normales se muestran en la Figura 22.

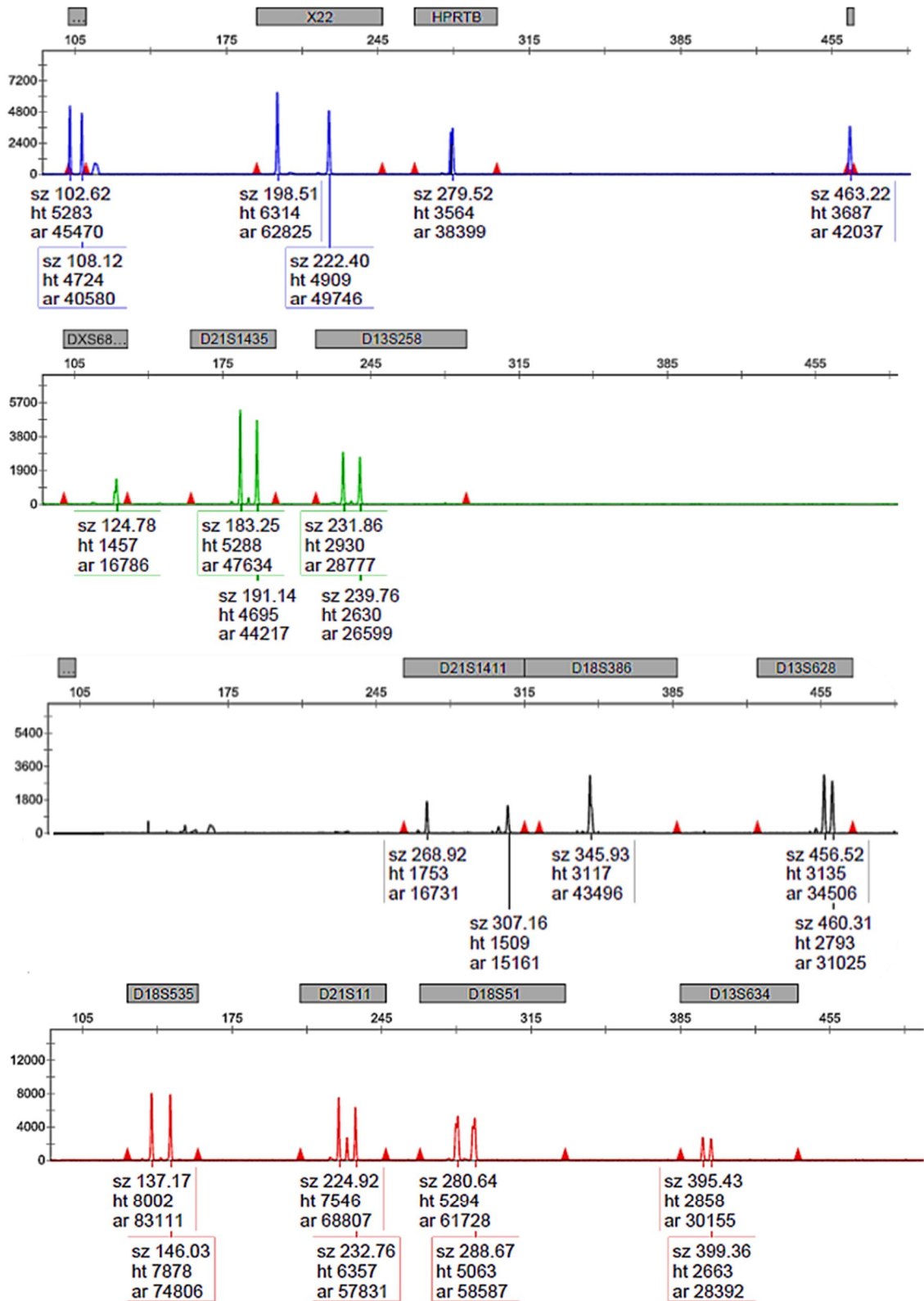


Figura 22. Electroferograma correspondiente a un feto masculino con patrón alélico normal para los cromosomas estudiados. En la caja de texto situada en la parte inferior de cada pico se refleja el tamaño en pb (sz), la altura del pico en unidades arbitrarias de fluorescencia (ht) y el área del pico (ar).

3.7 Arrays-CGH

Los análisis para detectar variaciones en el número de copias genómicas fueron externalizados a un laboratorio de referencia. Inicialmente se utilizaron plataformas que contenían 60.000 oligonucleótidos distribuidos a lo largo de todo el genoma, con una resolución de 200 Kb para la mayoría de las regiones (*Agilent Technologies*), aceptando como alteración en el número de copias del ADN aquella que tenga un mínimo de cinco sondas consecutivas, y presentado una cobertura general para la detección de cromosomopatías de aproximadamente 200 Kb para la mayoría de las regiones.

Posteriormente el análisis se realizó sobre una plataforma KaryoNIM® prenatal diseñado por NIMGenetics® para la detección de alteraciones genéticas relacionadas con patología prenatal (fabricado por *Agilent Technologies*), que incluye el estudio de las aneuploidías para todos los cromosomas junto a más de 100 síndromes clínicos. Se aceptaron como alteraciones aquellas que contenían 5 o más sondas consecutivas, siendo la resolución aproximada 250 Kb para los síndromes incluidos en el diseño y de 2 Mb para el resto del genoma.

3.8 Análisis estadístico

El análisis de los resultados se ha realizado utilizando el programa para análisis estadístico y epidemiológico de datos tabulados EPIDAT v3.1, mediante estadístico Z de comparación de poblaciones con proporciones independientes con un índice de confianza (IC) del 95%.

El estudio multivariante se ha realizado utilizando una distribución continua mediante prueba Chi-Cuadrado, aceptando un IC del 95%

4.- RESULTADOS

4.1- Características de la población de estudio

Se han analizado los criterios de selección para gestantes en riesgo de cromosomopatía y los resultados citogenéticos de 11523 amniocentesis (AC) realizadas durante el periodo comprendido entre 1989-2013.

Las amniocentesis se llevaron a cabo entre la 10ª y la 36ª semana gestacional. En función del momento de su realización hemos agrupado los resultados en tres categorías que se describen en la Tabla 7. La amniocentesis precoz se excluyó de la metodología para la obtención de la muestra prenatal a partir del año 2007, debido a su asociación con una mayor tasa de pérdida fetal y anomalías musculo-esqueléticas.

	Edad gestacional	n amniocentesis	Frec (%)
Amniocentesis precoces	<15	5335	44,67%
Amniocentesis medias	15-19	6338	53,07%
Amniocentesis tardías	> 19	269	2,25%

Tabla 7. Clasificación de las amniocentesis en función de la edad gestacional para la extracción de la muestra.

Los resultados del cultivo celular han sido satisfactorios en el 99,40% de las muestras recibidas, mientras que en 26 casos no se obtuvo crecimiento celular (0,22%) y en 43 cultivos no se consiguieron metafases para el análisis (0,37%). En total se han evaluado citogenéticamente 11.523 amniocentesis.

Un total de 350 casos no han sido incluidos en el trabajo al no presentar indicación original para análisis citogenético, aunque en todos ellos se realizó cariotipo. En estas gestaciones, la indicación para AC fue estudio de infecciones fetales, análisis de la madurez fetal, diagnóstico de enfermedades monogénicas o confirmación de un resultado citogenético previamente obtenido por biopsia corial.

4.2- Tasa de amniocentesis/año

La distribución anual de los estudios realizados en líquido amniótico se muestra en la Figura 23. Desde 1995 hasta 2007 el número de gestantes para realizar amniocentesis sufrió un incremento del 50%.

Hemos considerado relevante reflejar el momento de la introducción de la Biopsia Corial para mostrar una imagen completa de la evolución del número de procedimientos invasivos realizados durante el periodo analizado; esta metodología se implementó en la Sección de Medicina Fetal del Servicio de Obstetricia y Ginecología en el año 2002, incorporándose de manera rutinaria para análisis citogenético gestacional en el año 2009, dirigida fundamentalmente a gestaciones con cribado de 1º trimestre de alto riesgo.

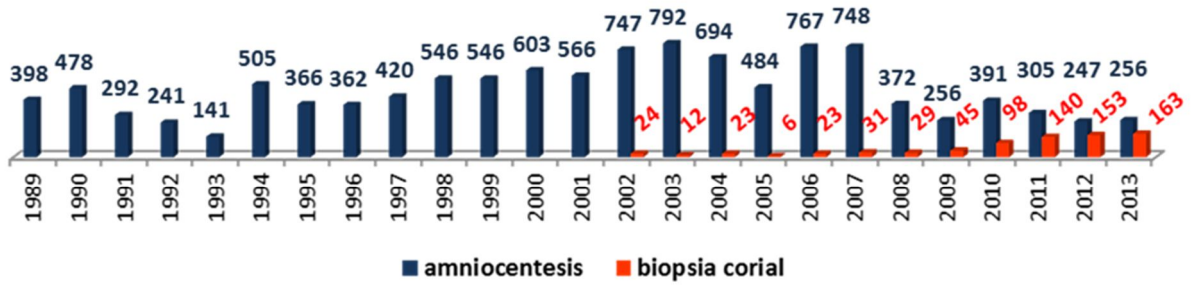


Figura 23. Representación del número de amniocentesis/año realizadas durante el periodo analizado. Se refleja también el número de biopsias coriales.

4.3- Tasa indicación para amniocentesis/año

La evolución de los criterios Edad materna avanzada, Marcador ecográfico, Screening bioquímico en suero materno, Cribado combinado de 1º trimestre y Ansiedad materna, durante los 25 años que comprende el estudio, se muestra en la Figura 28.

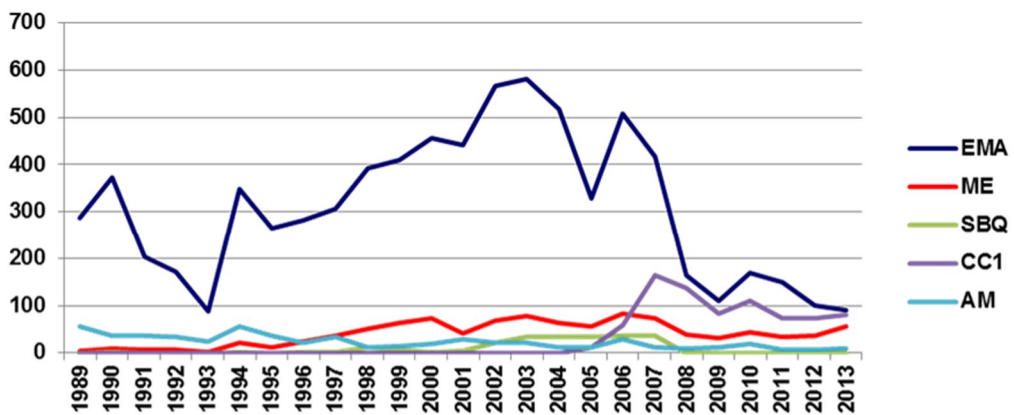


Figura 24. Evolución de las indicaciones más prevalentes para realizar amniocentesis.

La distribución de los marcadores ecográficos más prevalentes en nuestra población de estudio se representan en la Tabla 8.

Marcador	Frec (%)
Translucencia nucal mayor o igual al p95	55,78%
Higroma quístico	7,87%
Cardiopatía	3,70%
Feto acráneo	3,31%
Crecimiento intrauterino retardado (CIR)	3,24%
Onfalocele	2,87%
Holoprosencefalia	2,00%
Otros (con prevalencia <1%)	21,23%

Tabla 8. Frecuencias de distintos marcadores y malformaciones ecográficas encontradas en el estudio.

Contribución de los diferentes marcadores y/o malformaciones ecográficas

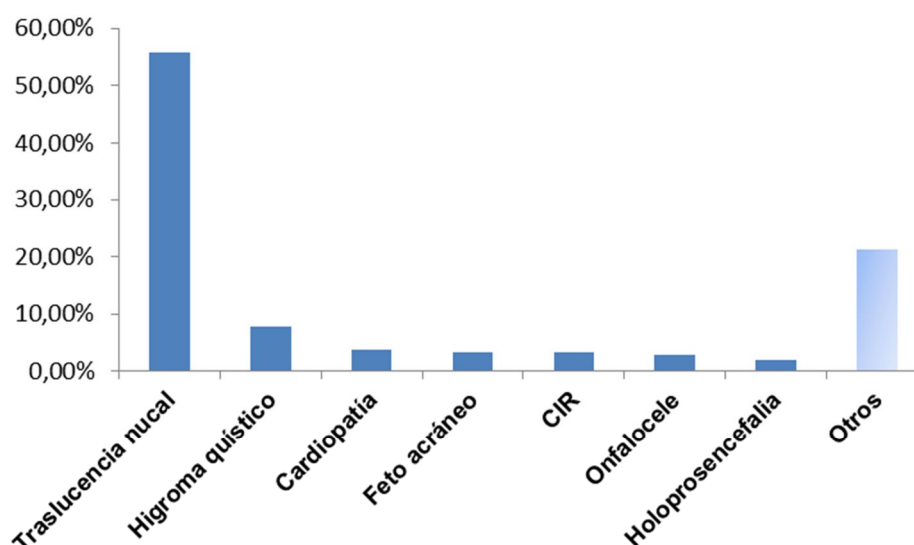


Figura 25. Representación de los distintos marcadores y/o malformaciones ecográficas referidas para estudio invasivo. CIR: crecimiento intrauterino retardado. Otros: marcadores con frecuencias <1%.

A partir de la implementación del Cribado combinado del 1º trimestre, la translucencia nucal aumentada fue incluida dentro de los marcadores que integran el algoritmo para realizar este test. Hasta ese momento, se mostró como el marcador más prevalente dentro de este criterio.

4.4- Tasa de amniocentesis por indicación

El número total de amniocentesis realizadas en base al criterio de referencia se representa en la Tabla 9.

Indicación		n	Frec (%)
Edad materna avanzada (≥ 35 años)	EMA	7723	67,02
Marcador y/o malformación ecográfica	ME	1020	8,85
Cribado combinado 1º trimestre	CC1	790	6,85
Ansiedad materna	AM	581	5,04
Hijo anterior con cromosopatía <i>de novo</i>	HCN	499	4,33
Malformación congénita previa	MCP	330	2,86
Screening bioquímico del 2º trimestre en suero materno	SB	231	2
Pareja portadora reordenamiento cromosómico	PPR	194	1,69
Gestante con historia de abortos	HA	155	1,34

Tabla 9. Resultados de las frecuencias encontradas para las diferentes indicaciones recogidas en el estudio.

Contribución de los diferentes marcadores y/o malformaciones ecográficas



Figura 26. Representación de la contribución de cada una de las indicaciones al total de amniocentesis realizadas.

A partir del año 2007 se empezó a realizar el Cribado combinado de aneuploidías en el primer trimestre, alcanzándose la plena implementación en el año 2009. En el total de amniocentesis realizadas, este criterio ha supuesto el 6.85% de las pruebas invasivas, alcanzando el 30% en el último quinquenio del estudio. La indicación Hijo anterior con cromosopatía *de novo* incluye tanto aneuploidías como RCEs en embarazos anteriores, mientras que el grupo *Screening* bioquímico en suero materno contiene aquellas gestaciones donde el cribado para la detección de aneuploidías se llevó a cabo durante el segundo trimestre gestacional. Las Gestantes con historia de abortos se han considerado como aquellas que, presentando ambos miembros de la pareja cariotipo normal, han tenido al menos dos abortos anteriores.

Dada la amplitud del periodo de estudio, hemos considerado importante analizar la distribución de las indicaciones en 5 quinquenios. Estos resultados muestran en la Tabla 10 junto con los resultados del estudio estadístico realizado.

El resultado del estudio estadístico para la comparación de las frecuencias de gestantes remitidas por Hijo anterior con malformación congénita, en los periodos anterior y posterior a la implementación de los Arrays-CGH, han presentado un valor $p=0,025$.

	1989-1993		1994-1998		1999-2003		2004-2008		2009-2013		Comparativa 2004-2008 y 2009-2013
	n	Frec (%)	n	Frec (%)	n	Frec (%)	n	Frec (%)	n	Frec (%)	
EMA	1121	72,32	1594	72,45	2454	75,43	1935	63,13	619	42,54	p<0,001
ME	33	2,12	145	6,59	325	9,99	316	10,3	201	13,81	p<0,001
CC1	-	-	-	-	-	-	370	12,07	420	28,86	p<0,001
SBQ	1	0,06	18	0,81	70	2,15	142	4,63	-	-	-
AM	185	11,93	160	7,27	106	3,25	75	2,44	55	3,78	P<0,05
HCN	92	5,93	107	4,86	97	2,98	111	3,62	92	6,32	p<0,001
MCP	83	5,35	108	4,9	78	2,39	38	1,23	23	1,58	p=0,429
PPR	25	1,61	45	2,04	73	2,24	33	1,07	18	1,23	p=0,744
HA	10	0,64	23	1,04	50	1,53	45	1,46	27	1,85	p=0,398
Total	1550	100	2200	100	3253	100	3065	100	1455	100	

Tabla 10. Frecuencias de las diferentes indicaciones en los cinco periodos de estudio. Estudio estadístico entre los dos últimos quinquenios del análisis.

4.5- Resultados citogenéticos

Hemos identificado un total de 517 cromosomopatías (4,48%) de las cuales 383 (3,32%) han correspondido a alteraciones numéricas (74,08% del total de las anomalías cromosómicas) y 134 a Reordenamientos Cromosómicos Estructurales (RCEs) (1,16%). Más de la mitad de las anomalías cromosómicas numéricas correspondieron a trisomías autosómicas (266; 51,44%). En la categoría de RCEs hemos diferenciado dos grupos en base al origen del reordenamiento, así los RCEs de origen parental han presentado una incidencia del 0,74% mientras que los RCEs *de novo* han mostrado una prevalencia del 0,41% en el total de los cariotipos realizados.

En la Tabla 11 se muestran las frecuencias de cromosomopatías detectadas en cada uno de los periodos del estudio, junto al análisis estadístico de la comparación de proporciones mediante estadístico Z entre un periodo y el anterior.

Quinquenios	Total AC	Total cromosomopatías		n	frec (%)	p=0,891	p=0,908	p=0,994	p<0,05
		n	frec (%)						
1989-1993	1550	64	4,12						
1994-1998	2199	94	4,27						
1999-2003	3254	140	4,30						
2004-2008	3065	131	4,27						
2009-2013	1454	88	6,05						

Tabla 11. Frecuencias de cromosomopatías identificadas en cada uno de los periodos en los que se ha estructurado el análisis.

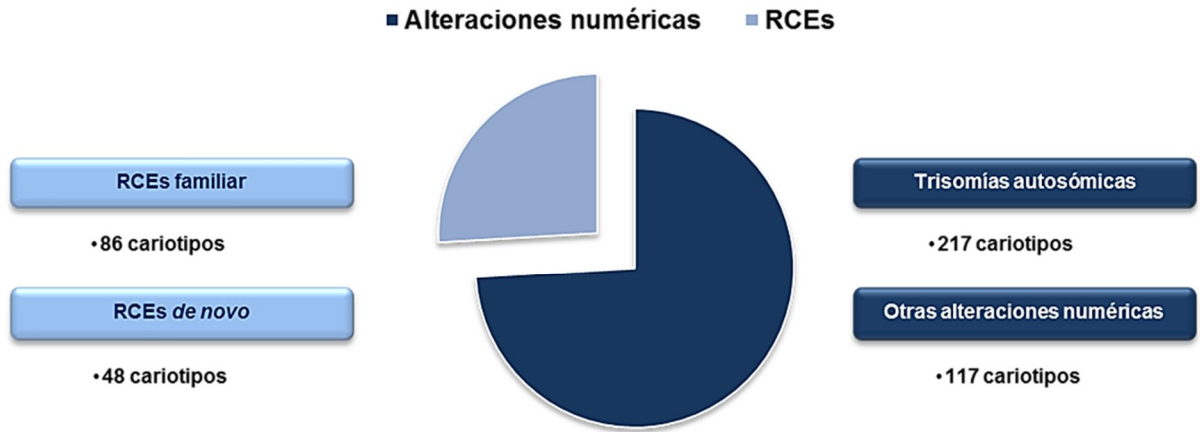


Figura 27. Representación gráfica de las alteraciones numéricas y reordenamientos cromosómicos estructurales identificados en la serie analizada.

4.5.1- Alteraciones numéricas

En la Tabla 12 se representan los diferentes tipos de alteraciones numéricas encontradas en este análisis, así como su contribución a la patología numérica total junto a la incidencia en el global de amniocentesis. Las aneuploidías autosómicas clásicas (trisomía 21, trisomía 18 y trisomía 13) han supuesto el 69,4% de las alteraciones numéricas y el 41,97% del total de cromosomopatías identificadas en este trabajo.

En la categoría “Otras” se han incluido diferentes alteraciones numéricas que presentan prevalencias muy bajas en los estudios cromosómicos prenatales. En 5 casos se han diagnosticado en línea única (Doble aneuploidía n=2; Trisomía 19 n=1; Trisomía 22 n=1; Trisomía 7 n=1) mientras que en mosaico hemos encontrado 9 casos (Trisomía 20 n=3; Tetraploidía n=2; Trisomía 9 n=1; Trisomía 12 n=1; Trisomía 17 n=1; Trisomía 5 n=1).

ANEUPLOIDÍAS	n	Frecuencia sobre el total de aneuploidías (%)	Frecuencia sobre el total de amniocentesis (%)
+21	182	47,51	1,57
+18	65	16,97	0,56
45,X0	49	12,79	0,42
47,XXY	25	6,52	0,21
Triploidía	19	4,96	0,16
+13	19	4,96	0,16
47,XXX	10	2,61	0,08
Otras	14	3,65	0,12
Total	383	100	3,32

Tabla 12. Frecuencias de las diferentes indicaciones en los 5 quinquenios de análisis.

Contribución de las alteraciones numéricas más prevalentes.

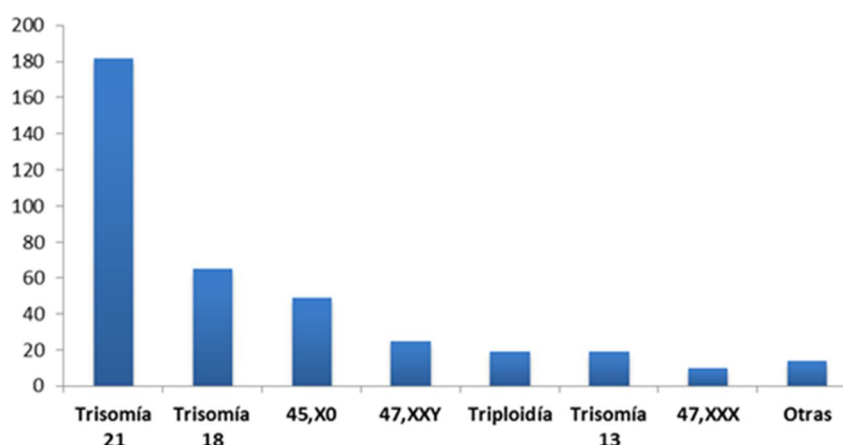


Figura 28. Representación gráfica de las diferentes categorías de anomalías numéricas identificadas en la serie analizada.

Las aneuploidías que han implicado a los cromosomas sexuales han supuesto el 21,93% de las alteraciones numéricas (0,72% sobre el total de amniocentesis analizadas). El 78,94% de los cariotipos con triploidía mostraban una dotación sexual XXX, mientras que el 21,05% restante correspondían a XXY.

Hemos analizado la frecuencia de anomalías numéricas en cada uno de los quinquenios, junto al análisis estadístico de la comparación de proporciones mediante estadístico Z entre un periodo y el anterior, como se refleja en la Tabla 13.

Quinquenios	Total AC	Numéricas		p valor entre los diferentes quinquenios
		n	Frec (%)	
1989-1993	1550	46	2.96	p=0,600
1994-1998	2199	73	3.31	
1999-2003	3254	110	3.09	p=0,963
2004-2008	3065	99	3.23	
2009-2013	1454	55	3.78	p=0,792
				p=0,384

Tabla 13. Incidencia de aneuploidías en los cinco periodos del análisis y significación estadística entre un periodo y el anterior.

La capacidad de detección para trisomía 21 y trisomía 18 en los cinco quinquenios del análisis se muestran en la Tabla 14, así como el valor de significación estadística de la comparación de proporciones, mediante estadístico Z, entre la incidencia de estas anomalías en los dos últimos periodos del análisis.

	1989-1993		1994-1998		1999-2003		2004-2008		2009-2013		
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
n AC	1550		2199		3254		3065		1454		
Trisomía 21	19	1.22	30	1.36	48	1.47	51	1.66	35	2.4	
Trisomía 18	10	0.64	16	0.72	16	0.49	15	0.48	7	0.48	
p valor para trisomía 21								p=0,122			
p valor para trisomía 18								p=0,848			

Tabla 14. Incidencia de trisomía 21 y 18 en los cinco quinquenios del análisis. Significación estadística entre las frecuencias de los dos últimos periodos.

La incidencia de las diferentes anomalías numéricas, en función de las indicaciones más prevalentes, se presenta en la Tabla 15. Hemos analizado el nivel de significación para esta capacidad, mediante estadístico Z para comparación de proporciones, entre la indicación Edad materna avanza y Marcador ecográfico así como entre Edad materna avanzada y Cribado combinado del 1º trimestre. Asimismo, hemos calculado la significación estadística entre las frecuencias encontradas para los cariotipos 47, XXY y 47, XXX, con un resultado p=0,017, mostrando una proporción 2,5:1. Por otra parte, aunque el número de casos diagnosticados ha sido muy bajo, el nivel de significación para la capacidad de detección de anomalías infrecuentes entre las indicaciones Edad materna avanzada y Marcador ecográfico ha mostrado un p= 0,744.

Indicación	Total AC	Trisomía 21		Trisomía 18		p	
		n	(%)	n	(%)		
ME	1020	78	7,64	48	4,70	p<0,0001	
EMA	7723	68	0,88	17	0,22		
CC1	790	32	4,05	1	0,12		
		p<0,005				p=891	
Indicación	Total AC	Triploidía		47,XXX y 47,XXY		p	
		n	(%)	n	(%)		
ME	1020	16	1,56	5	0,49	p=0,51	
EMA	7723	1	0,01	24	0,31		
CC1	790	2	0,25	2	0,25		
		p<0,0001				p=0,952	
		p=0,015					
Indicación	Total AC	45,X0		Trisomía 13		p	
		n	(%)	n	(%)		
ME	1020	39	3,82	15	1,47	p<0,0001	
EMA	7723	6	0,07	4	0,05		
CC1	790	2	0,25	0	-		
		p<0,0001				p=0,824	
		p=0,355					

Tabla 15. Capacidad de detección de las indicaciones más prevalentes para las aneuploidías que han mostrado una mayor incidencia. Significación estadística. ME: marcador ecográfico; EMA: Edad materna avanzada; CC1: Cribado combinado de 1º trimestre

Las frecuencias globales de aneuploidías sexuales detectadas en las tres indicaciones reflejadas anteriormente, a partir del momento de la implementación del Cribado combinado del 1º trimestre se presentan en la Tabla 16.

Indicación		n amniocentesis	
		n	frec (%)
ME	313	4	1,27
EMA	2520	7	0,27
CC1	760	4	0,52

Tabla 16. Frecuencias correspondientes a aneuploidías sexuales una vez implementado el CC1.

4.5.2- Reordenamientos cromosómicos estructurales (RCEs)

De manera análoga al apartado anterior, hemos analizado la evolución de la capacidad de detección para RCEs a lo largo de los cinco quinquenios del estudio, cuya tasa global de detección en este trabajo ha sido del 1,16%.

Hemos examinado las frecuencias globales de RCEs diagnosticados en cada uno de los quinquenios, así como la incidencia de los casos diagnosticados *de novo*, los cuales han presentado una incidencia total del 0,41%. En ambos casos se ha realizado estudio mediante estadístico Z de comparación de proporciones, resultados que se representan en las Tablas 17 y 18.

Quinquenios	Total AC	total RCEs		
		n	frec (%)	
1989-1993	1550	18	1,16] p=0,652
1994-1998	2199	21	0,95	
1999-2003	3254	30	0,92] p=0,984
2004-2008	3065	32	1,04	
2009-2013	1454	33	2,26] p=0,715
] p<0,005

Tabla 17. Frecuencia de RCEs totales en los distintos periodos del estudio. Significación estadística.

Quinquenios	Total AC	RCEs <i>de novo</i>		
		n	frec (%)	
1989-1993	1550	5	0.32] p=0,786
1994-1998	2199	7	0.31	
1999-2003	3254	11	0.33] p=0,907
2004-2008	3065	14	0.45	
2009-2013	1454	11	0.75] p=0,581
] p<0,291

Tabla 18. Frecuencia de RCEs *de novo* en los distintos periodos del estudio. Significación estadística.

Las diferentes categorías de RCEs se reflejan en la Tabla 19, así como su contribución al total de cromosopatías diagnosticadas en este trabajo. También se representan, de manera específica, el tipo de origen de cada una de ellas.

Los RCEs equilibrados han mostrados tasas del 0,58% y 1,37% en los dos últimos quinquenios del estudio, mientras que las frecuencias para reordenamientos desequilibrados han sido del 0,45% y 0,89%, respectivamente. El estudio estadístico para la comparación de frecuencias de los reordenamientos equilibrados entre los dos periodos, ha mostrado un valor $p=0,011$, siendo $p=0,115$ para los reordenamientos desequilibrados.

De las 44 translocaciones recíprocas identificadas en el estudio, 18 se han detectado en embarazos que presentaban como indicación Pareja portadora de reordenamiento cromosómico (41,80%) de las cuales el 65% mostraban un origen paterno. Respecto a las inversiones, el 72% de los casos han correspondido a la categoría pericéntricas, siendo los cromosomas 4, 2 y 12 los que se han detectado con mayor frecuencia en esta categoría. Respecto a las translocaciones Robertsonianas, el 80% de los casos heredados presentaban un origen paterno; el 75% de estas translocaciones eran del tipo heteróloga der(13q;14q) y der(14q;21q).

Hemos detectado una tasa global para Derivados de translocación desequilibrados del 0,13%, mostrando un origen parental en el 80% de los caso, de los cuales, la pareja no era conocedora de su estado de portador en el 30% de las gestaciones.

En cuanto a las deleciones, el cromosoma 22 ha sido el implicado en estas alteraciones en el 27,27% de los casos y el 63,6% fueron intersticiales.

RCEs	Total	Sobre total RCEs	Sobre total amniocentesis	Origen parental		Origen <i>de novo</i>	
	n	Frec (%)	Frec (%)	n	sobre total amniocentesis Frec (%)	n	sobre total amniocentesis Frec (%)
Equilibradas	85	63,43	0,73	71	0,61	14	0,12
Trans. recíproca	44	32,83	0,38	37	0,32	7	0,06
Trans. Robertsoniana	23	17,16	0,19	20	0,17	3	0,02
Inversión	18	13,43	0,15	14	0,12	4	0,03
Desequilibradas	49	36,56	0,42	15	0,13	34	0,29
Delección	11	8,20	0,09	1	0,008	10	0,08
Cr. marcador	10	7,46	0,08	1	0,008	9	0,07
Derivado Trans. recíproca	8	5,97	0,06	7	0,06	1	0,008
Duplicación	8	5,97	0,06	1	0,008	7	0,06
Derivado Trans. Rob.	7	5,22	0,06	5	0,04	2	0,01
Isocromosoma	4	2,98	0,03	-	-	4	0,03
Cromosoma en anillo	1	0,74	0,008	-	-	1	0,008
Total	134	100	1,16	86	0,74	48	0,41

Tabla 19. Incidencia total de las diferentes categorías de RCEs. También se representan los datos correspondientes al origen *de novo* o heredado de estas alteraciones.

Hemos realizado el análisis de las diferentes categorías de RCEs en base a la indicación en la que han sido diagnosticados, cuyos resultados se muestran en la Tabla 20.

	ME		EMA		CC1		HCN		AM		PPR	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Equilibradas	5	0,49	27	0,34	10	1,26	-	-	3	0,51	38	19,58
Trans. Recíproca	1	0,09	18	0,23	3	0,37	-	-	3	0,51	18	9,27
Trans. Robertsoniana	3	0,29	3	0,03	2	0,25	-	-	-	-	16	8,24
Inversión	1	0,09	6	0,07	5	0,63	-	-	-	-	4	
Desequilibradas	10	1,47	19	0,24	1	0,12	3	0,601	3	0,51	7	3,69
Der. Translocación	5	0,49	1	0,01	-	-	1	0,2	1	0,17	7	3,55
Delección	5	0,49	4	0,05	-	-	2	0,4	-	-	-	-
Duplicación	3	0,29	3	0,03	1	0,12	-	-	1	0,17	-	-
sSMC <i>de novo</i>	-	-	8	0,1	-	-	-	-	1	0,17	-	-
Cr. en anillo e Isocromosmas	2	0,19	3	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 20. Frecuencias de las diferentes categorías de RCEs en función de la indicación para realizar amniocentesis. ME: marcador ecográfico; EMA: Edad materna avanzada; CC1: Cribado combinado de 1º trimestre; HCN: Hijo anterior con cromosomopatía *de novo*; AM: Ansiedad materna; PPR: Pareja portadora de reordenamiento cromosómico.

En la indicación Marcador ecográficos, hemos realizado análisis estadístico aplicado a la comparación de frecuencias de las diferentes categorías de RCEs frente a las diagnosticadas en el resto de indicaciones. Los resultados se presentan en la Tabla 21.

El origen de los sSMC se ha podido identificar en el 50% de los casos, con dos cromosomas marcadores derivados del cromosoma 15; de los 10 casos diagnosticados, 6 se han presentado en mosaico. No hemos identificado ningún caso de sSMC en el criterio Marcador ecográfico. El valor estadístico de la comparación de frecuencias de sSMC entre las dos únicas indicaciones en las que se han identificado estos reordenamientos ha sido $p=0,865$ (Edad materna avanzada y Ansiedad materna).

El análisis con estadístico Z de comparación de proporciones, ha mostrado un valor $p=0,011$ para las frecuencias detectadas de reordenamientos desequilibrados, entre la indicación Pareja portadora de reordenamiento cromosómico y Marcador ecográfico. El valor estadístico encontrado en la comparación de frecuencias para esta última indicación y el criterio Edad materna avanzada ha sido $p=0,0004$.

	Marcador ecográfico							
	Translocación Recíproca	Translocación Robertsoniana	Inversiones	Derivados de translocación	Delección	Duplicación	sSMC de novo	Cr. en anillo e Isocromosomas
EMA	0,60	0,99	0,70	<0,0001	<0,001	0,02	-	0,20
CC1	0,44	0,77	0,12	-	-	0,80	-	-
HCN	-	-	-	0,35	0,87	-	-	-
AM	0,27	-	-	0,56	-	0,95	-	-
PPR	<0,00001	<0,00001	<0,01	<0,001	-	-	-	-

Tabla 21. Resultados del estudio estadístico entre la indicación Marcador ecográficos y el resto de las indicaciones. ME, marcador ecográfico; EMA, Edad materna avanzada; CC1, Cribado combinado de 1º trimestre; HCN, Hijo anterior con cromosopatía *de novo*; AM, Ansiedad materna; PPR Pareja portadora de reordenamiento cromosómico.

4.6- Descripción de las alteraciones cromosómicas detectadas en función de la indicación de referencia y Valor predictivo positivo (VPP)

En la Tabla 22 se recogen las frecuencias de aneuploidías y RCEs detectados en cada una de las indicaciones consideradas para realizar prueba invasiva, así como las el porcentaje específico de reordenamientos estructurales *de novo* y de aquellos que han presentado un origen parental.

Indicación	n AC	TOTAL PATOLOGÍA		ANEUPLOIDÍAS		RCEs total		RCEs familiar		RCES <i>de novo</i>	
	n	frec (%)	n	frec (%)	n	frec (%)	n	frec (%)	n	frec (%)	
EMA	7723	174	2,25	128	1,65	46	0,59	20	0,25	26	0,33
ME	1020	225	22,05	205	20,09	20	1,96	9	0,88	11	1,07
CC1	790	49	6,2	40	5,06	9	1,13	7	0,88	2	0,25
AM	581	7	1,2	1	0,17	6	1,03	3	0,51	3	0,51
ACPN	499	8	1,6	5	1	3	0,6	-	-	3	0,6
MCP	330	3	0,9	2	0,66	1	0,3	-	-	1	0,3
SBQ	231	3	1,29	-	0,43	2	0,86	-	-	2	0,86
PPR	194	46	23,71	-	-	46	23,71	46	23,71	-	-
HA	155	2	1,29	1	0,64	1	0,64	1	0,64	-	-
Total	155	517	4,48	383	3,32	134	1,16	86	0,74	48	0,41

Tabla 22. Cromosomopatías encontradas en cada uno de los criterios para realizar amniocentesis. ME, marcador ecográfico; EMA, Edad materna avanzada; CC1, Cribado combinado de 1º trimestre; HCN, Hijo anterior con cromosomopatía *de novo*; AM, Ansiedad materna; PPR Pareja portadora de reordenamiento cromosómico; AC, amniocentesis.

A continuación analizamos de manera individual la distribución de las diferentes patologías, tanto numéricas como estructurales, en base a la indicación para realizar la prueba invasiva y el número de amniocentesis realizadas en cada criterio.

4.6.1- Pareja portadora de reordenamiento cromosómico (PPR)

En este grupo de gestantes no se han detectado anomalías numéricas. Los RCEs identificados han sido en su totalidad de origen familiar. En la Tabla 23 se muestran las diferentes categorías de RCEs detectadas en este criterio de indicación. El 4,12% de los RCEs diagnosticados en este grupo (8 casos) han correspondido a anomalías con posible repercusión fenotípica.

Padre portadores de reordenamiento estructural		
	n	frec (%)
RCEs familiares	46	23,71
Trans. Recíproca	19	9,79
Trans. Robertsoniana	15	7,73
Inversión	4	2,06
der. Trans. Recíproca	4	2,06
Derivado de Trans. Robertsoniana	3	1,54
Cr. Marcador	1	0,51

Tabla 23. Cromosomopatías identificadas en las gestantes remitidas por indicación Padres portadores de reordenamientos estructural.

4.6.2- Marcador y/o malformación ecográfica (ME)

Los embarazos remitidos para realizar amniocentesis por hallazgos ecográficos han presentado una frecuencia de cromosopatías del 22,05% (225 casos). Las anomalías numéricas han supuesto el 91,11% de las cromosopatías diagnosticadas en esta indicación. Se han detectado 16 casos de RCEs con posible repercusión fenotípica (1,56%).

En la Tabla 24 se incluyen las alteraciones cromosómicas halladas en los estudios citogenéticos realizados a estas gestantes.

Marcador ecográfico					
	n	frec (%)		n	frec (%)
Numéricas	205	20,03	RCEs	20	1,96
Trisomía 21	77	7,54	<i>de novo</i>	11	1,07
Trisomía 18	48	4,7	Delección	5	0,49
45,X0	39	3,82	Duplicación	2	0,19
Triploidía	16	1,56	Isocromosoma	1	0,09
Trisomía 13	15	1,47	Der Trans. rec	1	0,09
47,XXY	5	0,49	Trans. Reciproca	1	0,09
47,XX,+17/46,XX	1	0,09	Cr. en anillo	1	0,09
46,XX/92XXXX	1	0,09	parental	9	0,88
46,X0,+21	1	0,09	Der Trans. rec	3	0,29
47,XX,+7	1	0,09	Trans. Robertsoniana	3	0,29
47,XX,+19	1	0,09	Der trans. Roberts	2	0,19
			Inversión	1	0,09

Tabla 24. Cromosopatías identificadas en las gestantes con indicación Marcador ecográfico.

Anteriormente a la introducción del Cribado combinado del 1º trimestre, fueron referidas 707 gestantes para estudio citogenético por indicación Marcador ecográfico con medida de la translucencia nucal superior al percentil 95, aislado o asociado a otras malformaciones fetales, de las cuales 215 (30,4%) mostraron cariotipos patológicos.

Las diferencias encontradas en la capacidad de detección para aneuploidías y RCEs durante los dos últimos quinquenios del análisis se representan en la Tabla 25.

Marcador ecográfico	2004-2008		2009-2013		p valor
	n	frec (%)	n	frec (%)	
	316 amniocentesis		201 amniocentesis		
Anomalías numéricas	54	17,08	20	9,95	0,031
RCEs	7	2,21	11	5,47	0,084

Tabla 25. Resultados de la comparación de las frecuencias de cromosopatías entre los dos últimos quinquenios.

4.6.3- Cribado combinado de 1º trimestre (CC1)

En este grupo de gestantes se han identificado 48 cariotipos patológicos, lo que ha supuesto una frecuencia del 6,07%. El 81,63% de las alteraciones han correspondido a anomalías numéricas y el 18,36% restante a RCEs. Se han detectado 2 casos de RCEs con posible repercusión fenotípica (0,25%).

En la Tabla 26 se muestran los resultados citogenéticos detectados en esta indicación.

Cribado combinado 1º trimestre					
	n	frec (%)		n	frec (%)
Numéricas	39	4,93	RCEs	9	1,13
Trisomía 21	32	4,05	<i>de novo</i>	2	0,25
45,X0	2	0,25	trans. Reciproca	1	0,12
Triploidía	2	0,25	inversión	1	0,12
Trisomía 18	1	0,12	parental	7	0,88
47,XXY	1	0,12	inversión	4	0,5
47,XXX	1	0,12	trans. Reciproca	2	0,25
			trans. Robertsoniana	1	0,12

Tabla 26. Cromosomopatías identificadas en las gestantes remitidas por indicación Cribado combinado del 1º trimestre.

Las diferencias encontradas en la capacidad de detección para aneuploidías y RCEs durante los dos últimos quinquenios del análisis se representan en la Tabla 27.

Cribado combinado 1º trimestre	2004-2008		2009-2013		<i>p valor</i>
	n	frec (%)	n	frec (%)	
Anomalías numéricas	11	1,39	28	6,66	0,026
RCEs	2	0,54	7	1,66	0,249

Tabla 27. Resultados de la comparación de las frecuencias de cromosomopatías entre los dos últimos quinquenios.

Durante el periodo 2009-2013 se han diagnosticado 34 casos con trisomía 21, de los cuales 12 fueron remitidos por presentar Marcador ecográfico. De los 22 casos restantes, 21 gestantes fueron remitidas por resultados con riesgo alto en el Cribado combinado de 1º trimestre (95,45%) y 1 por Edad materna avanzada que no presentaba riesgo alto para CC1.

4.6.4- Edad materna avanzada (EMA)

Las amniocentesis realizadas en gestantes remitidas por Edad materna avanzada (≥ 35 años) han presentado 174 anomalías cromosómicas, lo que ha supuesto una capacidad de detección del 2,25%. El 73,56% de las cromosomopatías han correspondido a anomalías numéricas y el 26,43% a RCEs.

En la Tabla 28 se recogen las diferentes categorías de alteraciones numéricas y RCEs correspondientes a las amniocentesis realizadas por este criterio de selección.

En 29 casos se han encontrado anomalías estructurales con posible repercusión clínica (0,37%).

Edad materna avanzada					
	n	frec (%)		n	frec (%)
Numéricas	128	1,60	RCEs	46	0,59
Trisomía 21	69	0,89	de novo	26	0,33
Trisomía 18	16	0,20	cr. Marcador	7	0,09
47,XXY	16	0,20	trans. Reciproca	5	0,06
47,XXX	8	0,10	isocromosoma	4	0,05
45,X0	6	0,07	delección	3	0,03
Trisomía 13	4	0,05	duplicación	2	0,02
Triploidía	1	0,01	inversión	2	0,02
47,XX,+20/46,XX	2	0,02	der Trans. Roberts.	2	0,02
46,XY/92XXYY	1	0,01	trans. Robertsoniana	1	0,01
47,XY,+9/46,XY	1	0,01	parental	20	0,25
47,XY,+12/46,XY	1	0,01	trans. Reciproca	12	0,15
47,XY,+5/46,XY	1	0,01	inversión	4	0,05
48,XXY,+18	1	0,01	trans. Robertsoniana	1	0,01
47,XY,+22	1	0,01	der Trans. rec	1	0,01
			delección	1	0,01
			duplicación	1	0,01

Tabla 28. Cromosomopatías identificadas en las gestantes con indicación Edad materna avanzada.

La capacidad de detección de las diferentes alteraciones numéricas encontradas en esta indicación, durante los dos últimos periodos del análisis, se presentan en la Tabla 29, junto con los resultados del análisis estadístico realizado para la comparación de estas frecuencias.

	2004-2008		2009-2013		Comparativa
	n amniocentesis=1935		n amniocentesis=619		2004-2008 y 2009-2013
	n	Frec(%)	n	Frec(%)	
Alteraciones numéricas	29	1,49	7	1,13	p=0,633
Trisomía 21	16	0,82	1	0,16	p=0,136
Trisomía par sexual	5	0,25	3	0,48	p=0,642
Trisomía 18	2	0,10	1	0,16	p=0,759
Otras	6	0,31	1	0,16	p=0,862

Tabla 29. Alteraciones numéricas identificadas en la indicación Edad materna avanzada durante los dos últimos periodos del análisis.

Los Reordenamientos cromosómicos estructurales *de novo* identificados en los periodos 2004-2008 y 2009-2013 se reflejan en la Tabla 30.

	2004-2008		2009-2013		Comparativa
	n amniocentesis=1935		n amniocentesis=619		2004-2008 y 2009-2013
	n	Frec(%)	n	Frec(%)	
RCEs <i>de novo</i>	4	0,20	4	0,64	p=0,197

Tabla 30. Reordenamientos cromosómicas estructurales *de novo* identificados en la indicación Edad materna avanzada durante los dos últimos periodos del análisis.

La Tabla 31 recoge la incidencia de reordenamientos estructurales *de novo* en las indicaciones Edad materna avanzada y Ansiedad materna.

	Edad materna avanzada		Ansiedad materna		Valor p
	n amniocentesis=7723		n amniocentesis=581		
	n	Frec(%)	n	Frec(%)	
RCEs <i>de novo</i>	26	0,33	3	0,51	p=0,731

Tabla 31. Reordenamientos cromosómicas estructurales *de novo* diagnosticados en la indicación Edad materna avanzada durante los dos últimos periodos del análisis.

Con el objetivo de determinar si existen diferencias en la incidencia de los diferentes tipos de alteraciones cromosómicas en el grupo de gestantes remitidas por Edad materna avanzada, en función de la edad en el momento de la gestación, hemos dividido los datos en dos grupos: edad comprendida entre 35-39 años y edad ≥ 40 años. Los resultados se reflejan en la Tabla 32. En el quinquenio 2009-2013 se han diagnosticado 10 casos con síndrome de Down en

gestantes con edad ≥ 40 años, de los cuales 1 no fue detectado por el criterio Cribado combinado del 1º trimestre o Marcador ecográfico. Estos resultados infieren una tasa de detección en la indicación CC1 del 90%.

	1999-2003				2004-2008				2009-2013			
	35-39 años		≥ 40 años		35-39 años		≥ 40 años		35-39 años		≥ 40 años	
	n =1996		n=458		n=1430		n=505		n=313		n=306	
	n	frec %	n	frec %	n	frec %	n	frec %	n	frec %	n	frec %
Numéricas	22	1,10	15	3,27	14	0,97	15	2,97	1	0,31	6	1,96
Trisomía 21	11	0.55	10	2.18	7	0.49	9	1.78	-	-	1	0.32
Trisomía 18	3	0.15	-	-	1	0.06	1	0.19	1	0,31	-	-
Trisomía 13	-	-	1	0.21	-	-	-	-	-	-	1	0.32
Aneuploidía infrecuente	2	0,10	-	-	2	0.14	1	0.19	-	-	-	-
Doble aneuploidía	-	-	1	0.21	-	-	-	-	-	-	-	-
Triploidía	-	-	-	-	-	-	1	0.19	-	-	-	-
46XY/92XXYY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0.32
45,X0	1	0.05	1	0.21	2	0.14	-	-	-	-	-	-
47,XXY	4	0.2	2	0.43	-	-	1	0.19	-	-	3	0.98
47,XXX	1	0.05	-	-	2	0.14	2	0.39	-	-	-	-
RCEs de novo	8	0,40	1	0,20	3	0,20	1	0,20	-	-	4	1,26
Trans. Recíproca	3	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,32
Inversión	1	0,05	-	-	1	0,06	-	-	-	-	-	-
Delección	-	-	1	0,20	-	-	1	0,20	-	-	1	0,32
Duplicación	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,32
sSMC	1	0,05	-	-	2	0,13	-	-	-	-	1	0,32
Isocromosoma	3	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	30	1.4	16	3.49	17	1.18	16	3.16	1	0.31	10	3.22

Tabla 32. Alteraciones cromosómicas identificadas en la indicación Edad materna avanzada en función de la edad en el momento de la gestación. Se representan las tasas de detección de los tres últimos quinquenios del análisis.

De manera global, en la Tabla 33 hemos recogido las frecuencias totales de alteraciones cromosómicas en los dos grupos de edad, detectadas en los dos últimos quinquenios.

Edad materna	2004-2008		Edad materna	2009-2013	
	n	frec (%)		n	frec (%)
35-39 años (1430 amniocentesis)	17	1,18	35-39 años (313 amniocentesis)	1	0,31
≥ 40 años (505 amniocentesis)	16	3,16	≥ 40 años (306 amniocentesis)	10	3,22

Tabla 33. Frecuencias detectadas en gestantes con edad comprendida entre 35-39 años y ≥ 40 años en los dos últimos quinquenios del estudio.

4.6.5- Ansiedad materna (edad <35 años)

La incidencia de las diferentes alteraciones citogenéticas identificadas en las amniocentesis realizadas por el criterio Ansiedad materna, se recogen en la tabla 34. Las gestantes incluidas en este grupo no presentaron criterios clínicos sugestivos de cromosopatía, por lo que la capacidad diagnóstica de esta indicación (1,20%) no es un valor objetivo para valorar su eficacia, dado que se ha tratado de hallazgos ocasionales en una población al sesgada. Se han detectado 3 casos de RCEs (0,51%) con posible repercusión fenotípica.

Ansiedad materna					
	n	frec (%)		n	frec (%)
Numéricas	1	0,17	RCEs	6	1,03
45,X0	1	0,17	<i>de novo</i>	3	0,51
			deleción	1	0,17
			cr. Marcador	1	0,17
			der. Trans rec.	1	0,17
			parental	3	0,51
			t. recíproca	3	0,51

Tabla 34. Cromosopatías identificadas en las gestantes con indicación Ansiedad materna.

Las diferencias encontradas en la capacidad de detección para aneuploidías y RCEs durante los dos últimos quinquenios del análisis se representan en la Tabla 35.

Ansiedad materna	2004-2008		2009-2013		p valor
	75 amniocentesis		55 amniocentesis		
	n	frec (%)	n	frec (%)	
Anomalías numéricas	0	1,49	0	1,13	No calculable
RCEs	2	0,36	0	0,81	No calculable

Tabla 35. Resultados de la comparación de las frecuencias de cromosopatías entre los dos últimos quinquenios.

4.6.6- Hijo anterior con cromosopatía *de novo* (HAC)

En este grupo se han diagnosticado 8 casos con alteración cromosómica fetal (1,6%). El 62,5% de las anomalías encontradas han correspondido a aneuploidías y 37,5% restante a RCEs. El 0,60% de los RCEs diagnosticados en este grupo (3 casos) presentaban posible repercusión fenotípica.

En la tabla 36 se recogen las incidencias de las diferentes categorías de alteraciones numéricas y estructurales en las amniocentesis realizadas por este criterio.

Cromosomopatía previa de novo						
	n	frec (%)		n	frec (%)	
Numéricas	5	1,00	RCEs	3	0,60	
Trisomía 21	3	0,6	de novo	3	0,6	
47,XXY	1	0,2		deleción	2	0,4
47,XXX	1	0,2		der trans. Robets	1	0,2

Tabla 36. Cromosomopatías identificadas en las gestantes con indicación Hijo anterior con cromosomopatía previa *de novo*.

No hemos realizado estudio estadístico para comparación de frecuencias detectadas entre los dos últimos quinquenios, ya que esta indicación se encuentra dentro de los criterios preconceptionales para aconsejar amniocentesis, independientemente de las variaciones en la tasa de detección que se puedan haber producido durante el estudio.

4.6.7- Malformación congénita previa (MCP)

Hemos identificados tres casos con alteración cromosómica en estas gestantes, lo que ha supuesto una tasa de detección del 0,90%. La Tabla 37 muestra las diferentes cromosomopatías encontradas en las gestaciones referidas por esta indicación. Únicamente se ha detectado un RCEs con posible repercusión clínica (0,30).

Malformación congénita previa						
	n	frec (%)		n	frec (%)	
Numéricas	2	0,6	RCEs	1	0,3	
47,XXY	2	0,6	de novo	1	0,3	
				inversión	1	0,3

Tabla 37. Cromosomopatías detectadas en gestantes con indicación Hijo anterior con malformación congénita.

No hemos considerado necesario realizar estudio estadístico sobre las diferencias en las frecuencias de detección entre los dos últimos quinquenios, dado que esta indicación se encuentra dentro de los criterios preconceptionales para aconsejar amniocentesis, independientemente de las variaciones en la tasa de detección que se puedan haber producido durante el estudio.

4.6.8- Screening bioquímico del 2º trimestre en suero materno (SB)

Aunque este método de selección únicamente se utilizó para selección de gestantes en riesgo de aneuploidía durante pocos años, hemos estimado importante reflejar su capacidad de detección. Se detectaron 3 casos con anomalías cromosómicas (1,29%), de los cuales, el 0,86% correspondieron a RCEs con posible repercusión fenotípica.

En la Tabla 38 se recogen las incidencias de las diferentes alteraciones cromosómicas identificadas en las amniocentesis realizadas a estas gestantes.

Screening bioquímico del 2º trimestre en suero materno					
	n	frec (%)		n	frec (%)
Numéricas	1	0,43	RCEs	2	0,86
Trisomía 21	1	0,43	<i>de novo</i>	2	0,86
			duplicación	1	0,43
			der trans. Roberts	1	0,43

Tabla 38. Cromosomopatías identificadas en las gestantes con indicación *Screening* bioquímico del 2º trimestre en suero materno.

4.6.9- Gestante con historia de abortos (HA)

La frecuencia de alteraciones cromosómicas en parejas que referían historia obstétrica con abortos de repetición ha sido del 1,29% (2 casos). La gestación que presentó un resultado con inversión parental se incluyó en el estudio por informar los padres que sus cariotipos eran normales, aunque uno de los abortos referidos mostraba una inversión pericéntrica en el cromosoma 4, por lo que se decidió repetir el estudio citogenético a la pareja. No se han encontrado RCEs con posible repercusión clínica.

En la tabla 39 se recogen las cromosomopatías detectadas en Gestantes con historia de abortos.

Historia de abortos					
	n	frec (%)		n	frec (%)
Numéricas	1	0,64	RCEs	1	0,64
45,X0	1	0,64	familiar	1	0,64
			inversión	1	0,64

Tabla 39. Alteraciones cromosómicas identificadas en amniocentesis remitidas por Gestante con historia de abortos.

4.7- Capacidad diagnóstica de las indicaciones durante los quinquenios de análisis.

3.7.1- Alteraciones numéricas

La capacidad diagnóstica de las diferentes indicaciones para anomalías numéricas ha variado a lo largo del periodo analizado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 40.

	1989-1993			1994-1998			1999-2003			2004-2008			2009-2013		
	n AC	n	VPP	n AC	n	VPP	n AC	n	VPP	n AC	n	VPP	n AC	n	VPP
EMA	1121	26	2,32	1594	29	1,81	2454	37	1,5	1935	29	1,49	619	7	1,13
ME	33	17	51,51	145	44	30,34	325	70	25,53	316	54	17,08	201	20	9,95
AM	185	1	0,54	160	-	-	106	-	-	75	-	0,7	55	-	-
CC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	370	11	3,34	420	28	6,66
Otras	211	3	1,42	302	-	-	369	3	0,81	369	3	1,1	160	-	-
TOTAL	1550			2200			3253			3065			1455		

Tabla 40. Evolución de la capacidad diagnóstica de los criterios de selección durante el periodo de análisis. EMA, Edad materna avanzada; ME, marcador ecográfico; AM, Ansiedad materna; CC1, Cribado combinado del 1º trimestre; AC, amniocentesis. La indicación "Otras" incluye Pareja portadora de reordenamiento cromosómico, Hijo anterior con cromosomopatía *de novo*, Gestante con historia de abortos, Malformación congénita previa y Screening bioquímico de 2º trimestre en suero materno.

En base a los resultados reflejados en la tabla anterior, hemos realizado estudio estadístico para las frecuencias de alteraciones numéricas encontradas en cada una de las indicaciones durante los dos últimos periodos del análisis. Estos resultados se recogen en la Tabla 41.

Indicación	p valor
EMA	0,631
ME	0,666
AM	-
CC1	0,00001
Otras	-

Tabla 41. Significación estadística para las frecuencias de anomalías numéricas identificadas en las indicaciones más prevalentes durante los dos últimos quinquenios del estudio.

La evolución en las frecuencias de detección (%) de trisomía 21, trisomía 18, síndrome de Turner y trisomías sexuales se representan de forma gráfica en la Figura 29.

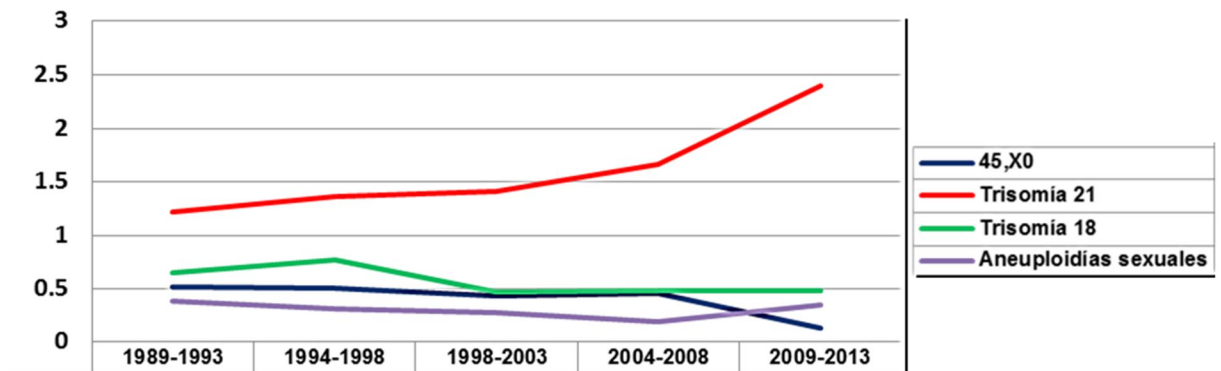


Figura 29. Representación gráfica de la capacidad de detección (Frec %) para las aneuploidías más frecuentes, durante los 5 periodos que comprende el estudio.

4.7.2- Reordenamientos cromosómicos estructurales (RCEs)

La capacidad diagnóstica global de los RCEs en función de la indicación de referencia, ha sufrido también variaciones a lo largo del periodo de estudio. En la Tabla 42 se reflejan los resultados obtenidos en el análisis realizado.

	1989-1993			1994-1998			1999-2003			2004-2008			2009-2013		
	n AC	n	VPP	n AC	n	VPP	n AC	n	VPP	n AC	n	VPP	n AC	n	VPP
EMA	1121	8	0,71	1594	11	0,70	2454	15	0,61	1935	7	0,36	619	5	0,80
ME	33	-	-	145	-	-	325	2	0,61	316	7	2,21	201	11	5,47
AM	185	1	0,54	160	1	6,25	106	2	1,88	75	2	2,66	55	-	-
CC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	370	2	0,54	420	7	1,66
Otras	211	10	4,73	302	10	3,31	369	13	3,52	369	16	4,33	160	10	6,25
TOTAL	1550			2200			3253			3065			1455		

Tabla 42. Capacidad diagnóstica para Reordenamientos cromosómicos estructurales de las indicaciones más prevalentes en los diferentes periodos del análisis. EMA, Edad materna avanzada ME, marcador ecográfico; AM, Ansiedad materna; CC1, Cribado combinado de 1º trimestre; AC, amniocentesis. La indicación "Otras" incluye Pareja portadora de reordenamiento cromosómico, Hijo anterior con cromosomopatía *de novo*, Gestante con historia de abortos, Malformación congénita previa y Screening bioquímico de 2º trimestre en suero materno.

En analogía al apartado anterior, hemos evaluado la capacidad de detección para las diferentes categorías de RCEs a lo largo de los 25 años del estudio, cuyos resultados se representan en la Tabla 43.

Categorías de RCEs	1989-1993		1994-1998		1999-2003		2004-2008		2009-2013	
	n	frec (%)	n	frec (%)	n	frec (%)	n	frec (%)	n	frec (%)
Translocación recíproca	4	0,25	11	0,50	12	0,36	10	0,32	7	0,48
Translocación Robertsoniana	7	0,45	3	0,13	2	0,06	7	0,22	4	0,27
Inversión	-	-	1	0,04	7	0,21	1	0,03	9	0,61
Delección	-	-	2	0,09	2	0,06	2	0,06	5	0,34
Cromosoma marcador	3	0,19	2	0,09	1	0,03	3	0,09	1	0,06
Derivado Trans. recíproca	1	0,06	1	0,04	3	0,09	1	0,03	2	0,13
Duplicación	1	0,06	1	0,04	-	-	4	0,13	2	0,13
Derivado Trans. Robertsoniana	2	0,12	-	-	-	-	2	0,06	3	0,2
Isocromosoma	-	-	-	-	3	0,09	1	0,03	-	-
Cromosoma en anillo	-	-	-	-	-	-	1	0,03	-	-
TOTAL	18		21		30		32		33	

Tabla 43. Tasas de detección de las diferentes categorías de RCEs durante el periodo comprendido en el estudio.

Hemos llevado a cabo un análisis estadístico para las frecuencias de detección de cada tipo de RCEs durante los periodos 2004-2008 y 2009-2013, cuyos resultados se muestran en la Tabla 44.

Categorías de RCEs	p valor
Translocación recíproca	0,593
Translocación Robertsoniana	0,978
Inversión	0,0003
Deleción	0,068
Cromosoma marcador	0,820
Derivado Trans. recíproca	0,509
Duplicación	0,706
Derivado Trans. Robertsoniana	0,393
Isocromosoma	-
Cromosoma en anillo	-

Tabla 44. Significación estadística entre las frecuencias detectadas en los periodos 2004-2004 y 2009-2013 para las diferentes categorías de RCEs.

4.8- Análisis multivariante entre las diferentes indicaciones

Hemos realizado un estudio multivariante utilizando prueba Chi-Cuadrado con IC (95%) entre las patologías detectadas en el criterio Edad materna avanzada y el resto de las indicaciones para realizar amniocentesis. Los resultados obtenidos se representan en la Tabla 45.

Indicaciones	Odss Ratio	IC 95%	p valor
MCP vs EMA	0,39	0,12-1,25	0,152
AM vs EMA	0,52	0,24-1,13	0,128
SBQ vs EMA	0,57	0,18-1,80	0,453
HA vs EMA	0,56	0,13-2,30	0,591
HCN vs EMA	0,70	0,34-1,44	0,424
CC1 vs EMA	2,25	1,58-3,18	p<0,001
ME vs EMA	12,27	9,94-15,16	p<0,001

Tabla 45. Análisis multivariante de las patologías cromosómicas encontradas en gestaciones remitidas por EMA y el resto de indicaciones para realizar amniocentesis. MCP, Malformación congénita previa; AM, Ansiedad materna; SBQ, *Screening* bioquímico en suero materno del 2º trimestre; HA, Gestante con historia de abortos; HCN, Hijo anterior con cromosomopatía *de novo*; CC1, Cribado combinado de 1º trimestre; ME, Marcador ecográfico; EMA, Edad materna avanzada.

5.- DISCUSIÓN

El asesoramiento genético en asociación con los procedimientos de diagnóstico prenatal constituye un elemento básico para la identificación de anomalías congénitas y trastornos genéticos, facilitando a la pareja una adecuada información que les permita tomar decisiones informadas respecto a la gestación. El estudio citogenético fetal se conoce desde hace más de 40 años como una metodología fiable y resolutive en circunstancias de riesgo para cromosomopatía, siendo su aplicación universal en países desarrollados (*Chitty et al., 2010*). El método invasivo utilizado más frecuentemente para la obtención de una muestra fetal es la amniocentesis (*Newberger et al., 2000*).

En este trabajo presentamos un análisis retrospectivo de los resultados citogenéticos obtenidos en 11.523 amniocentesis realizadas en un único centro público terciario de la Comunidad de Madrid, así como la evolución en las tendencias para la selección de gestantes en riesgo de cromosomopatía durante el periodo comprendido entre 1989 y 2013. Hasta el año 2002 la amniocentesis fue, junto con un pequeño número de Funiculocentesis, el método invasivo utilizado para la obtención de una muestra fetal. A partir de esa fecha se implementó progresivamente la Biopsia Corial como procedimiento para el diagnóstico cromosómico en el primer trimestre gestacional, como resultado de la incorporación de nuevos métodos de selección de gestantes con riesgo de anomalía cromosómica (Figura 23). La **tasa de éxito** para la obtención del cariotipo fetal mediante amniocentesis fue del 99,40%, semejante a la reportada en otras series (99,5%, *Mademont-Soler et al., 2011*; 99,5%, *Comas et al., 2014*; 99,5%, *Balkan et al., 2011*; 99,8%, *Nishiyama et al., 2015*; 98,8%, *Ocak et al., 2014*; 99,7%, *Karaoguz et al., 2006*), aunque posiblemente sesgada por los fallos de cultivo asociados a la implementación de la metodología en sus inicios.

De manera global hemos observado una variación importante en la tasa de amniocentesis/año durante el periodo analizado. Entre 1989 y 1994 el número de pruebas realizadas no siguió una pauta específica debido a una menor definición de los criterios para la selección de gestantes en riesgo de cromosomopatía, siendo la mayoría ellas remitidas por Edad materna avanzada o Ansiedad materna. A partir de 1995 y hasta 2007 se produjo un incremento del 50% en el número de amniocentesis realizadas, y aunque la edad materna siguió siendo el criterio principal para indicar esta técnica, se observó un leve aumento de las realizadas por Marcador ecográfico (Figura 24).

5.1 Indicaciones clínicas

Hemos observado una elevada divergencia respecto a los criterios para realizar estudio citogenético prenatal en la revisión bibliográfica realizada, fundamentalmente debida a las variaciones y evolución que han sufrido las indicaciones para recomendar esta prueba invasiva, así como a los periodos de análisis incluidos en cada uno de los trabajos consultados

(Karaoguz et al., 2006; Han et al., 2008; Balkan et al., 2011; Mademont-Soler et al., 2011; Chang et al., 2012; Danisman et al., 2013; Ocka et al., 2013; Comas et al., 2014; Ekin et al., 2014; Nishiyama et al., 2015). Nuestra distribución respecto al motivo por el cual realizar la prueba invasiva ha sido similar a la reportada por Chang et al., 2012, que refiere un periodo de análisis semejante al de este trabajo (Tabla 9).

La indicación Edad materna avanzada ha sido el criterio con mayor prevalencia en el periodo 1989-2013 (67,02%) en concordancia con los resultados reportados por Chang et al., 2012 (65,50%). Los informes de Balkan et al., 2011 y Ekin et al., 2014 revelan las frecuencias más bajas para esta indicación (24,9% y 28% respectivamente), debido al periodo de análisis que comprenden sus trabajos (a partir del año 2004), tratándose de grupos de trabajo que implementaron el cribado combinado del 1º trimestre tempranamente, en detrimento de la Edad materna avanzada como indicación aislada. Si consideramos los datos obtenidos en los dos últimos periodos del estudio, la tasa de amniocentesis por Edad materna se redujo significativamente ($p<0,001$) (Tabla 10), resultado que infiere la optimización de los criterios de selección al disminuir en 1500 casos el número total de amniocentesis realizadas. El cribado combinado del primer trimestre ha representado en el último periodo del estudio un 30% del total de indicaciones de estudio citogenético fetal, diferencia significativa con la frecuencia encontrada en el periodo 2004-2008, en el cual fue implementado este test ($p<0,001$) (Tabla 10). Aunque estas cifras son muy inferiores a las recogidas por otros autores, que alcanzan tasas entre el 50-70% de las amniocentesis realizadas (Ekin et al., 2014; Balkan et al., 2011; Ocak et al., 2014; Han et al., 2008), la incorporación de este criterio en la política sanitaria española para la selección de embarazadas en riesgo de trisomía 21, ha conseguido una disminución relevante en el número de pruebas invasivas, como reflejan los resultados de Mademont-Soler et al., 2011.

Respecto a los hallazgos de marcadores y/o malformaciones ecográficas, la indicación ha mostrado una frecuencia global dentro de los rangos reportados en la literatura (7-14,1%) (Mademont-Soler et al., 2011; Tseng et al., 2006; Balkan et al., 2011; Karaoguz et al., 2006; Danisman et al., 2013; Zhang et al., 2011; Ocak et al., 2014; Nishiyama et al., 2015), aunque inferior a la referida por Kohatsu et al., 2012 que encuentra una tasa del 82,3%; este estudio fue realizado en su país, donde no existe una política pública para el cribado prenatal, además de una dificultad de acceso a los servicios médicos, siendo referidas las gestantes a un centro terciario con edad gestacional muy avanzada, lo que facilita la detección de un elevado número de malformaciones congénitas. A pesar de la inclusión de la translucencia nucal como marcador en el test integrado para detección de trisomía 21, hemos observado un aumento significativo ($p<0,001$) (Tabla 10) en el número de amniocentesis realizadas por hallazgos ecográficos entre los dos últimos quinquenios, debido a la inclusión de otros marcadores

Además de los criterios intragestacionales, la ansiedad materna durante la gestación es una condición contemplada en todas las unidades Obstétricas por la repercusión que puede ocasionar en la embarazada y en su entorno familiar. En el global del análisis, el 5,04% de las amniocentesis (Tabla 9), se han realizado por este criterio, resultados semejantes a los referidos por *Mademont-Soler et al., 2011* aunque analizando un periodo de tiempo más corto. La prevalencia de esta indicación ha mostrado una disminución significativa ($p < 0,05$) (Tabla 10) a partir de la introducción del Cribado combinado del 1º trimestre, resultados coincidentes con los referidos por *Balkan et al., 2011* y *Nishiyama et al., 2015*.

En cuanto a las gestantes remitidas por Hijo anterior con cromosomopatía *de novo*, hasta el año 2003, la tasa de embarazadas incluidas este criterio fue disminuyendo progresivamente, mostrando un incremento significativo en los dos últimos quinquenios del estudio ($p < 0,001$) (Tabla 10). Este hecho está justificado por el asesoramiento genético que reciben las parejas posteriormente al hallazgo de una anomalía cromosómica en gestaciones previas.

El criterio Hijo anterior con malformación congénita ha presentado una disminución significativa entre los años anteriores y posteriores a la implementación de los Arrays-CGH en la práctica citogenética (año 2009) ($p < 0,05$; ver apartado 4.4 del documento), no detectando esta diferencia entre los dos últimos periodos del análisis (Tabla 10). Esta situación se ha debido al progreso en los estudios genéticos pediátricos para determinar la etiología de las malformaciones congénitas que, en caso de ser cromosómica, ha proporcionado información muy valiosa para establecer un consejo genético en futuras gestaciones. La misma observación ha sido referida por *Karaoguz et al., 2006*, *Danisman et al., 2013*, *Mademont-Soler et al., 2011*, con frecuencias semejantes a las encontradas en nuestro trabajo, en contraposición a los resultados de *Nishiyama et al., 2015* que presentan una incidencia del 4,4% al no disponer del cariotipo correspondiente a la gestación anterior. De manera global, esta indicación ha supuesto el 2,86% de las amniocentesis realizadas en este trabajo, no mostrando diferencias significativas entre las frecuencias detectadas en los dos últimos quinquenios analizados (Tabla 9 y Tabla 10). El resto de indicaciones no ha variado significativamente durante el estudio.

5.2 Capacidad de detección para cromosomopatías

Las series reportadas sobre amniocentesis para diagnóstico citogenético prenatal han manifestado un rango muy amplio en la detección de alteraciones cromosómicas (entre el 0,27 y 4,86%) (Méndez-Rosado et al., 2014; Chang et al., 2012; Tseng et al., 2006; Mademont-Soler et al., 2011; Karaoguz et al., 2006; Han et al., 2008; Comas et al., 2014; Ocak et al., 2014; Danisman et al., 2013; Ekin et al., 2014; Balkan et al., 2011). En nuestro estudio hemos encontrado una frecuencia del 4,48% (ver apartado 4.5 del documento), es decir, 1 de cada 23 cariotipos realizados presentaban una cromosomopatía, en consonancia con los resultados referidos por Balkan et al., 2011 y Ekin et al., 2014. Otros estudios muestran tasas superiores al 6%, debido fundamentalmente al elevado número de amniocentesis realizadas por hallazgos ecográficos anormales (Nishiyama et al., 2015). El 74,08% de las alteraciones han correspondido a anomalías numéricas y el 25,91% a reordenamientos estructurales (proporción 3:1) (ver apartado 4.5 del documento), hallazgo común en otros trabajos (Balkan et al., 2011; Chan et al., 2012; Karaoguz et al., 2006; Ekin et al., 2014; Mademont-Soler et al., 2011; Nishiyama et al., 2015). La capacidad de detección global de alteraciones cromosómicas ha mostrado diferencias significativas en el último quinquenio del estudio ($p < 0,05$) (Tabla 11).

5.2.1- Aneuploidías

Como era de esperar, las anomalías cromosómicas más comúnmente detectadas fueron aneuploidías autosómicas clásicas, las cuales han representado el 47,7% del total de cromosomopatías (Tabla 12). La capacidad de detección de estas alteraciones a lo largo de los diferentes quinquenios no ha mostrado diferencias significativas (Tabla 13), aunque las frecuencias han aumentado progresivamente, observación reflejada también en los trabajos de Mademont-Soler et al., 2011 y Comas et al., 2014.

La trisomía 21 es la alteración numérica más prevalente en estudios citogenéticos prenatales (0,66-2,62%) (Chang et al., 2012; Hang et al., 2008; Mademont-Soler et al., 2011; Ocak et al., 2014; Ekin et al., 2014; Nishiyama et al., 2015) dado que se trata de la aneuploidía autosómica con mayor viabilidad y a la cual están enfocados básicamente los programas de *screening* prenatal. Hemos detectado una frecuencia del 1,57%, constituyendo el 50% de las aneuploidías caracterizadas (Tabla 12). Estas cifras fueron superiores a las encontradas por Wallesley et al., 2012 (0,23%) en nacidos vivos, justificado por la tasa de mortalidad de este síndrome intraútero, así como por la interrupción de las gestaciones detectadas prenatalmente. Una vez implementado el criterio Cribado combinado del 1º trimestre, se ha detectado un incremento en el número de fetos con trisomía 21 diagnosticados en el último periodo del análisis, aunque el estudio estadístico no ha mostrado diferencias significativas ($p = 0,122$) (Tabla 14). Por el contrario y respecto a la capacidad diagnóstica de las indicaciones más prevalentes, la frecuencia de esta trisomía en el criterio Edad materna avanzada ha mostrado

tasas de detección muy inferiores cuando se han comparado con las indicaciones Marcador ecográfico ($p < 0,001$) y Cribado combinado del 1º trimestre ($p < 0,01$) (Tabla 15).

El Síndrome de Edwards (trisomía 18) es la segunda alteración numérica con mayor frecuencia gestacional, con porcentajes que oscilan entre 0,21-0,50% (Karaoguz et al., 2006; Mademont-Soler et al., 2011, Han et al., 2008, Ekin et al., 2014; Méndez-Rosado et al., 2014; Ocak et al., 2014, Balkan et al., 2011 y Chang et al., 2012). En nuestro análisis se ha detectado en el 0,56%, de las amniocentesis realizadas (Tabla 12). Esta aneuploidía es causa del aborto involuntario en 1 de cada 5 gestaciones, lo que justifica la diferencias entre las frecuencias prenatales y postnatales (0,06%; Wallesley et al., 2012). El 73,8% de los cariotipos diagnosticados con esta alteración fueron referidos por Marcador ecográfico, lo cual pone de manifiesto la elevada eficacia de este criterio para la selección de gestante en riesgo de aneuploidía, con diferencias significativas cuando se compara con la Edad materna avanzada ($p < 0,001$) (Tabla 15). En contraposición, la detección de trisomía 18 no ha mostrado diferencias entre EMA y CC1 ($p = 0,89$) (Tabla 15).

Las aneuploidías sexuales presentan frecuencias en nacidos vivos entre 0,25-0,40% (Boyd et al., 2011). La monosomía X es la aneuploidía sexual con mayor incidencia en nuestro estudio, probablemente debido al hecho de ser la única aneuploidía de los cromosomas sexuales asociada a hallazgos ecográficos; de hecho, el 80% de los casos (Tabla 15) se han identificado en gestantes referidas para estudio invasivo por este criterio (Balkan et al., 2011 y Ekin et al., 2014; Wu et al., 2013), no encontrando asociación de esta alteración con la indicación Edad materna avanzada, en consonancia con la observación aportada por Schinzel A., 2001, y mostrando una diferencia significativamente más inferior cuando se comprara con el criterio Marcador ecográfico ($p < 0,001$) (Tabla 15). El síndrome de Patau (trisomía 13) es la aneuploidía autosómica con menor frecuencia tanto en estudios prenatales como en recién nacidos (0,023%) (Wallesley et al., 2012); en nuestra serie ha presentado una prevalencia del 0,16% (Tabla 12), la cual se encuentra dentro de los rangos descritos en series anteriormente publicadas (0,03-0,35%; Han et al., 2008, Wu et al., 2013). La capacidad diagnóstica de la indicación Marcador ecográfico frente a la Edad materna avanzada ha presentado una diferencia significativa ($p < 0,001$) (Tabla 15). Las trisomías sexuales (47, XXY y 47, XXX) no han mostrado una asociación estrecha con ninguna de las indicaciones más prevalentes. (Tabla 15), aunque de manera global, el 69% de los cariotipos que mostraban estas aneuploidías se han identificado en madres con edad avanzada (24/35), observación semejante a la referida por Vlatkovic et al., 2014. A pesar de que el algoritmo para el cribado combinado del 1º trimestre ha demostrado una alta eficacia para detectar síndrome de Down, no se muestra sensible para la identificación de aneuploidías sexuales; así, el trabajo reportado por Viuff et al., 2015 refleja una tasa de detección para estas aneuploidías del 30% y de manera

específica para síndrome de Turner, síndrome de Klinefelter, cariotipo 47, XXX y 47, XYY del 38%, 13%, 16% y 5% respectivamente. En nuestra serie hemos detectado un porcentaje similar de aneuploidías sexuales en esta indicación (26,66%), a partir de la inclusión del Cribado combinado del 1º trimestre (Tabla 16).

Las gestaciones con cariotipos triploides son muy raras dado que dos tercios de estas gestaciones se pierden antes de la 15ª semana de gestación. Las tasas de detección prenatal oscilan entre 0,01-0,09% (*Chang et al., 2012, Wu et al., 2013; Karaouguz et al., 2006; Ocak et al., 2014, Mademont-Soler et al., 2011*) mientras que en nuestra serie han presentado una frecuencia del 0,16% (Tabla 12). Cerca del 90% de los casos han sido detectados en fetos con marcador ecográfico mostrando una diferencia significativa frente a los detectados en Edad materna avanzada ($p < 0,001$) (Tabla 15), junto a una dotación sexual XXX en el 78,90% de los cariotipos con esta patología (ver apartado 4.5.1 del documento). Las referencias bibliográficas respecto a la incidencia prenatal de aneuploidías infrecuentes son muy escasas; únicamente hemos encontrado una publicación de *Ekin et al., 2014*, en la que describe una tasa del 0,19%, algo superior a la encontrada en nuestro estudio (0,12%) (Tabla 12). Estas cifras son más altas que las descritas en nacidos (0,086%; *Wallesey et al., 2012*) debido a la elevada letalidad que llevan implícitas. No hemos encontrado diferencias significativas en la capacidad de detección para estas alteraciones entre las indicaciones Marcador ecográfico y Edad materna avanzada ($p = 0,744$) (ver apartado 4.5.1 del documento).

5.2.2- Reordenamientos cromosómicos estructurales (RCEs)

La información disponible en relación a los Reordenamientos cromosómicos estructurales (RCEs) es muy pobre. El diagnóstico de estas anomalías constituye una situación de difícil gestión en el asesoramiento genético y requiere tanto una evaluación citogenética cuidadosa como una interpretación estricta del significado clínico. Es de gran importancia obtener el cariotipo de los padres para determinar si el reordenamiento ha sido heredado o *de novo*.

En este estudio hemos encontrado que 1 de cada 86 amniocentesis (1,16%) (ver apartado 4.5.2 del documento) presentaba un reordenamiento estructural; como era de esperar, esta frecuencia ha sido superior a la referida en nacidos vivos (0,24%) (*Gardner and Sutherland, 2004*) debido a las interrupciones voluntarias de embarazo por la posible repercusión clínica y letalidad de estas alteraciones. Este dato ha sido concordante con el obtenido por *Han et al., 2008* (1,19%) y muy similar al reportado por *Balkan et al., 2011* y *Ekin et al., 2014* (1,21% y 1,36% respectivamente), aunque superior a la reportada por *Nishiyama et al., 2015* (1,06%). La comparación de las frecuencias de detección entre los dos últimos quinquenios del estudio ha mostrado diferencias significativas ($p < 0,005$) alcanzando una tasa del 2,26% en el periodo 2009-2013 (Tabla 17), la más elevada reflejada en series publicadas con un periodo de estudio

semejante. Esta capacidad diagnóstica se ha debido fundamentalmente a la incorporación de nuevas tecnologías a las técnicas citogenéticas convencionales (sondas FISH para diagnóstico de microdeleciones y Arrays-CGH) así como la mejora de los estudios fetales por incorporación de nuevos marcadores a los estudios con ultrasonidos.

La mayoría de las anomalías estructurales prenatales son de origen familiar (Caron *et al.*, 1999), y conllevan un riesgo muy bajo de repercusión clínica (Caron *et al.*, 1999; Gardner and Sutherland, 2004), sin embargo, en ocasiones los hijos de portadores de estas alteraciones presentan anomalías fenotípicas aun cuando la alteración es semejante a los padres, lo que ocasiona controversias en cuanto a la etiología de las malformaciones.

La identificación de un RCEs *de novo* está asociada en muchas circunstancias a efectos fenotípicos adversos. Nuestro trabajo ha mostrado una prevalencia del 0,41% (ver apartado 4.5.2 del documento), similar a la descrita por Tseng *et al.*, 2006 y superior a la reportada por Park *et al.*, 2003 (0,30%); si la alteración es aparentemente equilibrada, la probabilidad de repercusión se estima en aproximadamente 10% (Warburton *et al.*, 1991; Peng *et al.*, 2006), sin embargo, cuando se detecta un desequilibrio cromosómico, la afectación fetal es difícil de predecir ya que depende fundamentalmente del contenido génico de las regiones delecionadas o duplicadas y de la distribución génica adyacente a los puntos de rotura. No hemos detectado diferencias significativas en la detección de reordenamientos *de novo*, aunque su frecuencia de detección ha aumentado a lo largo del estudio (Tabla 18).

5.2.2.1- Reordenamientos equilibrados

Como era de esperar, la indicación que ha presentado mayor frecuencia para estos reordenamientos ha sido Pareja portadora de reordenamiento estructural (PPR) (Tabla 20). Estas alteraciones se postulan como cromosomopatías con baja probabilidad de repercusión clínica por lo que su identificación se produce habitualmente al azar. Excluyendo la indicación PPR, la frecuencia de reordenamientos equilibrados no han mostrado diferencias significativas entre el criterio Marcador ecográfico y el resto de indicaciones (Tabla 21).

Los trabajos prenatales que recogen resultados para estas alteraciones muestran frecuencias entre 0,50-0,93% (Wu *et al.*, 2013; Yakut *et al.*, 2014; Ekin *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2012; Karaouguz *et al.*, 2006; Nishiyama *et al.*, 2015; Mademont-Soler *et al.*, 2011; Balkan *et al.*, 2011), mientras que estos valores disminuyen al 0,1% en recién nacidos (Warburton *et al.*, 1991) probablemente debido a que la mayoría de estas anomalías no muestran repercusión clínica y por tanto no son identificadas en los sujetos portadores. Nuestros datos están en consonancia con los anteriormente descritos, reflejando una frecuencia del 0,73% (Tabla 19). La detección de RCEs equilibrados durante el último quinquenio de nuestro análisis se ha incrementado hasta el 1,37% (ver apartado 4.5.2 del documento), tasa superior a la descrita por Ekin *et al.*, 2014, presentando diferencias

estadísticamente significativas en su comparación con las detectadas en el quinquenio 2004-2008 ($p < 0,05$).

5.2.2.1.1 *Translocaciones recíprocas*

Las series prenatales sin sesgo por indicación reflejan que estas alteraciones son los RCEs balanceados que presentan una mayor incidencia en estos estudios (1/200-1/390) (*Han et al., 2008; Chang et al., 2013; Ekin et al., 2014; Peng et al., 2006*), resultados conformes con los reflejados en nuestro análisis (1/262 amniocentesis; 0,38%) (Tabla 19). En el 51% de los casos, la indicación para realizar amniocentesis ha sido Parejas portadoras de estas anomalías (ver apartado 4.5.2 del documento), mostrando este criterio una sensibilidad significativa para la detección de estas alteraciones frente al criterio Marcador ecográfico ($p < 0,001$) (Tabla 21).

El 50% de las parejas portadoras de este reordenamiento no conocían su estado de portador antes de realizar la amniocentesis, observación realizada también por *Chen et al., 2005; 2010*.

La importancia clínica de estas cromosopatías depende tanto del equilibrio de dosis génica como del origen de la alteración; si éste es familiar, el riesgo es bajo; sin embargo algunos autores le atribuyen un impacto fenotípico severo en individuos portadores de la misma anomalía que su parental, debido a mecanismos de disomía uniparental o microdelección en loci adyacentes al punto de rotura (*Smeets et al., 1992; Wagstaff et al., 1995; Liao et al., 2011, Giardino et al., 2006*). En nuestro estudio, la tasa de estos reordenamientos heredados ha sido del 0,32% (Tabla 19), no detectando prenatalmente asociación con alteraciones ecográficas en ninguno de los fetos afectados, en consonancia con los resultados de *Vasilevska et al., 2013*. La aplicación de Array-CGH en estos fetos no fue posible dado que su identificación ha sido anterior a la implementación de esta metodología. Estudios previos encuentran que la mayoría de las veces, las translocaciones recíprocas heredadas presentan un origen paterno, encontrando resultados semejantes en nuestro trabajo (65% del total; apartado 4.5.2 del documento) (*Thomas et al., 2006*).

Las translocaciones recíprocas *de novo* son menos habituales en citogenética prenatal, con frecuencias menores del 0,1% (*Vasilevska et al., 2013; Warburton et al., 1991; Peng et al., 2006*), magnitud similar a la detectada en nuestro análisis (0,06%) (Tabla 19). El conocimiento del origen y los mecanismos de formación parental de las translocaciones recíprocas *de novo* es limitado. El riesgo de anomalías congénitas severas para estas alteraciones *de novo* se estima entre 6,1-6,6% (*Warburton D., 1991, 2006*). En nuestro estudio, 1 de cada 1666 amniocentesis (0,06%) (Tabla 19) han presentado esta cromosopatía, en concordancia con los resultados de *Giardino et al., 2009*. La aplicación de los Array-CGH en este tipo de cromosopatía ha demostrado una elevada eficacia para establecer la posible repercusión fenotípica, así *De Gregori et al., 2007* encuentran que el 42% de los individuos con esta alteración analizados en su trabajo y que mostraban fenotipo anormal, presentaban delecciones

críticas. En nuestro estudio no se ha podido realizar el seguimiento de los nacidos con translocación recíproca, sin embargo, a partir de la introducción de los Array-CGH hemos diagnosticado una translocación *de novo* con delección heterocigota en el punto de rotura de uno de los cromosomas implicados, que presentaba como indicación Marcador ecográfico para realizar amniocentesis (doble burbuja gástrica y agenesia de cuerpo calloso). El resto de translocaciones recíprocas *de novo* fueron diagnosticadas anteriormente a la implementación de las técnicas citogenómicas.

La translocación (11; 22) es la más prevalente dentro de este grupo de anomalías (Ohye *et al.*, 2010); resultado observado también en nuestro trabajo. Hemos encontrado que, de manera independiente, el cromosoma 11 ha sido el implicado con mayor incidencia en las translocaciones recíprocas, no encontrando referencias para esta observación en la literatura.

5.2.2.1.2 Translocaciones Robertsonianas (ROBs)

Las Translocaciones Robertsonianas se han presentado con una frecuencia del 0,19% (Tabla 19), dos veces superior a la descrita en nacidos vivos, dado que los padres portadores de este tipo de anomalía tienen mayor probabilidad de someterse a un diagnóstico prenatal citogenético, y en consonancia con los rangos descritos en la bibliografía (0,10-0,38%) (Wu *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2006; Balkan *et al.*, 2011; Valisewska *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2012; Ekin *et al.*, 2014; Keymolen *et al.*, 2011). Exceptuando la indicación Pareja portadora de reordenamiento estructural, no hemos detectado diferencias significativas en la incidencia de estas alteraciones en las diferentes indicaciones (Tabla 21). Aproximadamente 1/3 de las parejas no conocían su estado de portador previamente a la amniocentesis. Se ha descrito que los productos resultantes de la segregación meiótica, en varones portadores de translocaciones Robertsonianas, se originan principalmente por el modo de segregación alternativa (> 75,0%), dando lugar a gametos equilibrados, datos que se correlacionan con los encontrados en este trabajo (80% de los casos) (Honda *et al.*, 2000; Antón *et al.*, 2004). Como era de esperar, respecto a la composición cromosómica de las translocaciones Robertsonianas, en el 75% de los casos se trataban de ROBs heterólogas del tipo der(13q;14q) y der(14q;21q) (Zhao *et al.*, 2015).

La mayoría de las ROBs fueron heredadas (86,9%; 0,17% frecuencia en el total de amniocentesis) (Tabla 19), semejante a las razones que muestran los trabajos de Peng *et al.*, 2006 y Keymolen *et al.*, 2011, de las cuales únicamente el 13% mostraron marcador ecográfico en revisiones posteriores a su identificación. Una pequeña proporción han sido originadas *de novo* (<15%; 0,02% frecuencia en el total de la serie) (Tabla 19), cifra similar a la presentada por Giardino *et al.*, 2009 y Peng *et al.*, 2006. La repercusión fenotípica de ROBs *de novo* se estima en 3,7% (Warburton D., 1991), sin que en el momento actual se haya podido actualizar este riesgo para mejorar el consejo genético prenatal.

5.2.2.1.3 Inversiones

Estas anomalías equilibradas muestran prevalencias similares a las translocaciones Robertsoniana en las series prenatales (0,10-0,26%) (Yakut *et al.*, 2014; Tseng *et al.*, 2006; Mademont-Soler *et al.*, 2011; Karaouguz *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2013), con una frecuencia en nuestro estudio del 0,15% (Tabla 19). Tal como ocurre en el resto de reordenamientos equilibrados, la identificación de estas alteraciones ha mostrado una diferencia significativa en la indicación Pareja portadora de reordenamientos estructural cuando se ha comparado con el resto de criterios de selección ($p < 0,01$) (Tabla 21). Su origen es predominantemente familiar (el 78% de las identificadas en nuestro trabajo presentaban esta condición; Tseng *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2006). Varios autores demuestran que los portadores de este reordenamiento presentan un incremento en el riesgo de descendencia con un cariotipo recombinante desequilibrado frente a las translocaciones recíprocas y Robertsonianas (Balicek *et al.*, 2001; Bocian *et al.*, 2005). La bibliografía refleja que 2/3 de las inversiones son pericéntricas, cifra semejante a la encontrada en nuestra serie (aproximadamente un 70%) (Muss *et al.*, 2007). En nuestro estudio, los cromosomas 4, 2 y 12 han sido los más frecuentemente implicados en inversiones pericéntricas (ver apartado 4.5.2 del documento), mientras que no hemos detectado diferencias en los implicados en la categoría paracéntricas. Bargaonkar *et al.*, en 1997 encuentra resultados similares para las pericéntricas y una prevalencia mayor de los cromosoma 3 y 7 en las paracéntricas. Esta discordancia puede ser debida al pequeño número de inversiones paracéntricas detectadas en nuestra serie.

Las inversiones *de novo* se describen con frecuencias inferiores al 0,03% (Giardino *et al.*, 2009; Tseng *et al.*, 2006; Warburton D., 1991; Peng *et al.*, 2006), encontrando en nuestro análisis una incidencia del 0,03% (Tabla 19). Según Warburton D., 1991 se trata de los RCEs aparentemente equilibrados con mayor probabilidad de repercusión, estableciendo un riesgo de anomalías fenotípicas severas del 9,4%. Aunque el número de casos ha sido muy limitado (4/18), ninguno de ellos estaba asociado a la indicación Marcador ecográfico.

Hasta la introducción de los Array-CGH, el consejo genético que se podía establecer, tanto en inversiones familiares como *de novo*, era el reportado por Warburton D., 1991. Esta metodología nos ha permitido depurar el riesgo de reordenamiento adicional en dos casos con inversión familiar, no detectando en ninguno de ellos variación en el número de copias, mientras que en los casos *de novo* no se pudo utilizar esta metodología por detectarse anteriormente a la implementación de Array-CGH.

De manera general, en el manejo de las gestaciones en las que se ha diagnosticado un RCEs equilibrado, independientemente de su origen, es imprescindible un examen ecográfico exhaustivo así como establecer el origen de la alteración.

5.2.2.2- Reordenamientos desequilibrados

Los desequilibrios cromosómicos conllevan, en su mayoría, una repercusión clínica severa. En ocasiones estas alteraciones se pueden identificar prenatalmente, así en nuestra serie, 1 de cada 238 amniocentesis realizadas mostraban este tipo de anomalía (0,42%) (Tabla 19), en consonancia con las frecuencias descritas en trabajos precedentes (0,10-0,55%) (*Karaoguz et al., 2006; Wu et al., 2013; Yakut et al., 2014; Han et al., 2008; Chang et al., 2012; Mademont-Soler et al., 2011; Nishiyama et al., 2015; Balkan et al., 2011; Ekin et al., 2014*). Estos desequilibrios son muy raros en nacidos vivos y se observan con una frecuencia del 0,03% (*Gardner and Sutherland, 2004*).

Tal como puede esperarse, las parejas portadoras de un reordenamiento equilibrado son las que han presentado mayor tasa de gestaciones desequilibradas, mostrando diferencias significativas en la comparación con la tasa de detección encontrada en la indicación Marcador ecográfico ($p < 0,05$) (ver apartado 4.5.2 del documento). Cuando se contrasta la tasa de detección para estas alteraciones entre Marcador ecográfico y Edad materna avanzada, las diferencias estadísticas son aún mayores ($p < 0,001$). La detección de RCEs desequilibrados durante el último quinquenio del análisis se ha incrementado hasta el 0,89% (incluyendo 3 casos con Microdelección 22q11.2), tasa superior a la descrita por *Ekin et al., 2014.*, aunque no ha mostrado significación estadística cuando se ha comparado con las frecuencias del periodo 2004-2008. ($p = 0,115$).

5.2.2.2.1 Derivados de translocación desequilibrados

La prevalencia de estas anomalías en el presente estudio ha sido del 0,13% (ver apartado 3.5.2 del documento), superior a la encontrada por *Mademont-Soler., 2011* (0,05%), *Karaoguz et al., 2006* (0,06%), *Vasilevska et al., 2013* (0,05%) y *Nishiyama et al., 2015* (0,07%). Cuando el origen de estas alteraciones es parental, únicamente se detectan en estudios prenatales si el producto de la meiosis es viable (*Fressen et al., 2008*), ya que en caso contrario estas anomalías dan lugar a efectos deletéreos que terminan en abortos muy tempranos, no alcanzando la etapa gestacional para realizar la amniocentesis. Además de la indicación Parejas con reordenamiento estructural, el criterio Marcador ecográfico ha sido la indicación que ha mostrado mayor capacidad de detección para estas alteraciones con un valor $p < 0,001$ cuando se ha comparado con el criterio Edad materna avanzada (Tabla 21), de acuerdo con los resultados de *Fressen et al., 2008, Chen et al., 2009; 2011* y *Vasilevska et al., 2013*. *Chen et al., 2011* refleja que en un elevado número de casos, la pareja no conocía su estado de portador de translocación equilibrada, siendo los resultados prenatales los que han revelado esta situación; en nuestro estudio el 30% de las gestaciones han mostrado esta característica. Respecto a los derivados de translocación con origen *de novo*, los cuales se producen por errores aleatorios en la gametogénesis o por roturas cromosómicas y reunión errónea en

cromosomas interfásico, es bien conocido que se asocian a trastornos en el neurodesarrollo, cuyas frecuencias prenatales son <0,5% (Vasilevska et al., 2013); en el presente estudio han mostrado una prevalencia del 0,026% (Tabla 19).

5.2.2.2 Deleciones

Los datos en la bibliografía de la incidencia de deleciones son muy limitados. Se han estimado frecuencias de alrededor del 0,02% en nacidos vivos (Forrester and Merz, 2007; Wallesley et al., 2012), el 70% de los cuales presentan malformaciones graves, fundamentalmente cardiopatías (Baena et al., 2003; Forrester et al., 2007). Algunos trabajos realizados sobre deleciones familiares de pequeño tamaño no encuentran afectación fenotípica cuando se producen en determinados cromosomas (Yakut et al., 2015). La prevalencia de estas cromosomopatías en nuestra serie ha sido del 0,095% (Tabla 19), donde el origen *de novo* se ha identificado en el 91% de los casos, lo que concuerda con los resultados de otras series publicadas anteriormente (0,007-0,18%) (Chang et al., 1012; Jacobs et al., 1992; Yakut et al., 2014; Han et al., 2008; Nishiyama et al., 2015; Mademont-Soler et al., 2008; Ekin et al., 2014; Balkan et al., 2011). La capacidad de detección prenatal se encuentra, según algunos estudios, entre el 30-50% (De Vigan et al., 2001; Stoll et al., 2001, 2002; Forrester and Merz, 2002; Baena et al., 2003; Wallesley et al., 2012); estas diferencias se deben fundamentalmente a la resolución de las técnicas de citogenética convencional utilizadas y a la disponibilidad de la metodología Arrays-CGH en los distintos laboratorios. Hemos detectado las deleciones del cromosoma 22 con una mayor frecuencia (27,27% de los casos) respecto al resto de los cromosomas implicados en estas alteraciones (4, 6, 8, 9, 14, 16, 18 y X), los cuales han presentado una incidencia similar. Estos resultados coinciden con los de Forrester et al., 2007 pero no con los publicados por Lin et al., 2014, que encuentra una mayor frecuencia de deleciones del cromosoma 5 y Forobosco et al., 2009 del cromosoma 4. La capacidad de detección del criterio Marcador ecográfico (0,49%) (Tabla 20) ha sido significativa en comparación con la indicación Edad materna avanzada (0,05%) ($p < 0,001$) (Tabla 21). En nuestra serie, el 63,6% de las deleciones fueron intersticiales (ver apartado 4.5.2 del documento), resultado semejante al de Yakut et al., 2014, mientras que Lin et al., 2014 encuentran una tasa mayor para deleciones terminales (74,2%).

Es de resaltar que la proporción de sexos en este tipo de alteraciones no ha sido equilibrada, con una proporción 2:1 de cariotipos femeninos respecto a los masculinos, encontrando otros autores incluso una mayor desproporción entre sexos (Hook et al., 1984, Forrester and Merz, 2007, Lin et al., 2014).

5.2.2.2.3 Duplicaciones

En base a los resultados publicados por *Walllesley et al., 2012*, la capacidad de detección prenatal de estas alteraciones es limitada. Estos autores describen una tasa de duplicaciones en nacidos vivos del 0,007%, con una capacidad de detección prenatal del 48%, siendo el cromosoma 15 el que se encuentra implicado con una mayor frecuencia (14%). Además establecen que se han descrito duplicaciones en todos los cromosomas del complemento humano excepto en los cromosomas 21 e Y, y la ausencia de diferencias en el *sex ratio*, lo cual corroboramos en nuestro estudio. Respecto a la repercusión fenotípica de las duplicaciones, generalmente muestran un menor impacto clínico que las deleciones, por lo que el número de síndromes clínicos asociados a las duplicaciones es muy pequeño, al contrario de los que sucede con las deleciones. Además, este tipo de anomalías se detectan con menor frecuencia que las deleciones, a pesar de que ambos eventos pueden originarse por el mismo mecanismo de desalineamiento y entrecruzamiento desigual mediado por la presencia de repeticiones de bajo número de copias (*Forobosco et al., 2009; Stankiewicz et al., 2002*). La prevalencia encontrada en las amniocentesis muestra valores entre 0,02-0,21% (*Chan et al., 2012; Ekin et al., 2014*), rango dentro del cual se encuentran nuestros resultados (0,069%; 1/1500 amniocentesis realizadas) (Tabla 19). En consonancia con los resultados de *Forobosco et al., 2009* hemos detectado diferencias en la identificación de deleciones (1/1000 amniocentesis realizadas) frente a duplicaciones (1/1500), aunque menos marcada. Es probable que esta diferencia en su detección se deba a la dificultad de identificarlas con las técnicas citogenéticas convencionales, produciendo un sesgo a favor de las deleciones. La mayor parte de estas alteraciones se originan *de novo*, mostrando una frecuencia en nuestra serie del 87% (0,06% en el total de la serie) (Tabla 19), siendo tres veces superior a la reportada por *Wu et al., 2013*. El criterio Marcador ecográfico ha mostrado una mayor capacidad de detección para duplicaciones que la indicación Edad materna avanzada, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Tabla 21).

5.2.2.2.4 Cromosomas marcadores supernumerarios (sSMC)

La caracterización de un sSMC *de novo* en los estudios prenatales tiene una enorme importancia para establecer un consejo genético adecuado, dado que se trata de alteraciones estructurales que, dependiendo del cromosoma de origen así como del contenido génico, pueden dar lugar a graves alteraciones fenotípicas o ser considerados benignos. Así, *Warburton D., 1991* y *Liehr et al., 2009* describen un riesgo de repercusión severa del 14,7%, cuando los sSMC se originan de cromosomas no satelitados y entre el 7-10,9% para los que proceden de satelitados. Si se detecta un sSMC derivado del cromosoma 15 se debe descartar disomía uniparental (responsable en algunas ocasiones del síndrome de Prader-Willi), situación que sucede en el 5-10% de los sSMC derivados de este cromosoma (*Liehr et al., 2005*). En

nuestra serie hemos podido establecer el origen de estos marcadores en el 50% de los casos, de los cuales dos correspondían a derivados del cromosoma 15, en uno de los cuales no se pudo descartar disomía uniparental, por no disponer de metodologías adecuadas en los primeros 15 años de este trabajo. Se admite que en la población general existen $2,7 \times 10^6$ individuos portadores de cromosomas marcadores, el 70% de los cuales son fenotípicamente normales; sin embargo entre el 30-50% de las gestaciones con sSMC que se diagnostican prenatalmente son interrumpidas por el riesgo de repercusión clínica. Todo esto pone de manifiesto la necesidad de mejorar el establecimiento de la correlación genotipo-fenotipo en estas anomalías para mejorar el asesoramiento genético.

La incidencia estimada en estudios prenatales en líquido amniótico no seleccionados es del 0,059-0,14% (Malvestiti et al., 2014; Liehr et al., 2007; Wu et al., 2013), acompañándose de un riesgo global de anomalías fenotípicas del 26% (Graf et al., 2006). Nosotros hemos encontrado una frecuencia del 0,086% (Tabla 19). Alrededor del 70% de los casos se manifiestan en mosaico (Malvestiti et al., 2014; Dalpra et al., 2005; Starke et al., 2003), lo que corroboramos en nuestra serie.

No hemos identificado sSMC en gestaciones referidas por Marcador ecográfico y la incidencia de estos reordenamientos entre las indicaciones Edad materna avanzada y Ansiedad materna no ha mostrado diferencias significativas, por lo que estos reordenamientos no parecen estar asociados a la edad de la gestante en el momento de la gestación. Este resultado había sido encontrado anteriormente por Forobosco et al., 2009, sin embargo Malvestiti et al., 2014 encuentra una mayor prevalencia de determinados tipos de sSMC en gestantes con edad ≥ 35 años.

5.2.2.2.5 Cromosomas en anillo e Isocromosomas

Los cromosomas en anillo llevan implícita una gran variabilidad en la expresión clínica, de manera que cada individuo portador presenta un fenotipo diferente. Las manifestaciones clínicas dependen del tamaño de la delección a la que da lugar este reordenamiento, así como del cromosoma implicado (Guilherme et al., 2011). En nuestro análisis hemos encontrado un solo caso (0,008%) (Tabla 19) correspondiente a un cromosoma en anillo del cromosoma 4, cuya indicación para realizar amniocentesis fue Marcador ecográfico; la prevalencia de estas alteraciones ha sido menor a la reportada en las series contrastadas, que oscilan entre 0,011-0,020% (Chang et al., 2012; Hang et al., 2008; Yakut et al., 2015), esta baja frecuencia puede deberse a la inclusión de algunos cariotipos con este tipo de cromosomas en el grupo de cromosomas marcadores, debido al pequeño tamaño que presentaban.

Los Isocromosomas son los RCEs desequilibrados que muestran **menos** prevalencia en estudios prenatales (0,011-0,020%) (Chang et al., 2012; Wu et al., 2013), aunque en nuestro trabajo han presentado una incidencia superior (0,034%) (Tabla 19); estas alteraciones han

sido diagnosticadas en gestaciones con indicación Marcador ecográfico o Edad materna avanzada, aunque no hemos encontrado diferencias significativas entre las frecuencias detectadas en ambos criterios.

De las diferentes cromosopatías referidas anteriormente, que incluyen desde aneuploidías graves hasta reordenamientos posiblemente benignos, se deduce que la identificación de una alteración cromosómica requiere una interpretación individualizada de las posibles consecuencias clínicas, utilizando la metodología obstétrica y citogenética a nuestro alcance, que nos permita transmitir una información clara y objetiva a las parejas para tomar la decisión más adecuada respecto al embarazo.

5.3 Valor predictivo positivo (VPP) de las diferentes indicaciones

El VPP más elevado, entendido como el porcentaje de cariotipos anormales detectados en una indicación específica, ha sido el correspondiente al criterio Padres portadores de reordenamiento estructural (23,71%) (Tabla 22 y Tabla 23). Debido a la alta probabilidad de transmisión, tanto de gametos equilibrados como desequilibrados, se trataba de un hallazgo esperado, con unas frecuencias semejantes a las descritas en la bibliografía, con valores de hasta el 42% (*Mademont Soler et al., 2011; Gaudry et al., 2012; Chang et al., 2012; Ekin et al., 2014*).

Si excluimos estos resultados y en consonancia con otras series publicadas, el hallazgo de un marcador y/o malformación ecográfica ha sido la indicación más eficiente para la selección de gestantes en riesgo de cromosopatía, lo que confirma que los estudios ecográficos juegan un papel esencial en la detección alteraciones citogenéticas prenatales. Hemos identificado un VPP para este criterio del 22% (Tabla 22 y Tabla 24), cifra muy superior a las descritas por *Han et al., 2008, Tseng et al., 2006, Karaouguz et al., 2006, Balkan et al., 2011, Mademont-Soler et al., 2011, Chang et al., 2012, Danisman et al., 2013 y Ekin et al., 2014*, con rangos entre 5,3-11,3% y similar a los encontrados por *Lichtenbelt et al., 2011 y Nishiyama et al., 2015*. Atribuimos estas diferencias a que nuestro trabajo se ha realizado en un Centro hospitalario terciario, de referencia para embarazos de riesgo tanto en el 1º como en el 2º trimestre gestacional, lo que supone una cifra elevada de gestaciones con anomalías ecográficas. De manera específica, este criterio ha manifestado la capacidad de identificación más elevada para trisomía 21, trisomía 18, síndrome de Turner, triploidías y aneuploidías raras. La translucencia nuchal aumentada, considerada como marcador aislado, se ha asociado en el 30,4% de los casos con alteraciones cromosómicas (ver apartado 4.6.2 del documento), demostrando ser una medición de alta eficacia para la identificación de estas anomalías, tal como encuentran *Nicolaidis et al., 2004 y Alamillo et al., 2013*. Estos autores asocian la incidencia de anomalías cromosómicas con el grosor de la translucencia nuchal, de manera que tamaños entre 3,50-3,9 mm conllevan un riesgo de cromosopatías del 10%; entre 4-4,9 mm (50%), entre 5-5,9mm

(46%), 6-6,9mm (50%), 7-7,9 (40%) y medidas > 8,2 mm, 100%. En este trabajo no hemos analizado esta relación entre el grosor de la translucencia nuchal y el porcentaje de aneuploidías porque este marcador ecográfico, como ya se ha explicado anteriormente, no se considera por sí solo para indicar una técnica invasiva, sino que está incluido dentro del Cribado combinado del 1º trimestre. A partir de la introducción del criterio CC1, la capacidad diagnóstica para anomalías numéricas en la indicación Marcador ecográfico ha disminuido, mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$) (Tabla 25), debido a la exclusión de la medida de la translucencia nuchal de este criterio. Sin embargo, la capacidad de detección tanto de RCEs totales como RCEs desequilibrados se ha incrementado un 3%, como consecuencia del perfeccionamiento de los estudios ecográficos y la introducción de otros marcadores junto a la incorporación de la metodología Array-CGH y nuevas sondas en la técnica de Hibridación *in situ* fluorescente; a pesar de este incremento no se observan diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,084$) (Tabla 25).

Desde la implementación del cribado combinado de 1º trimestre, el VPP de este criterio ha mostrado un aumento de 5 puntos porcentuales en la detección de alteraciones numéricas ($p < 0,05$) (Tabla 27). Estos resultados demuestran la optimización alcanzada por el algoritmo para el test de cribado, con una capacidad de detección del 6,66% (Tabla 26), porcentaje similar al encontrado por *Alamillo et al., 2013* y superior a los descritos por otros autores (*Mademont-Soler et al., 2011, Chang et al., 2012; Balkan et al., 2011; Ekin et al., 2014; Nishiyama et al., 2015*) que encuentran tasas entre el 2,2-5,3%. Hemos considerado relevante reseñar que aproximadamente un tercio de las cromosomopatías diagnosticadas en este grupo de selección (15/48) han sido diferentes a las incluidas en el test de cribado de 1º trimestre, tal como describen anteriormente *Alamillo et al., 2013*, con alteraciones que han variado desde aneuploidías potencialmente letales hasta RCEs que requieren estudios genéticos adicionales para determinar su estado de equilibrio. Estos hallazgos generan una elevada ansiedad en la embarazada, por lo que consideramos necesario realizar un consejo genético previo a la realización del método invasivo para informar de estas posibles situaciones, que van a implicar un manejo gestacional diferente al esperado.

Los trabajos publicados desde la década de los años 70 hasta el estudio de *Forobosco et al., 2009* corroboran el incremento del riesgo de aneuploidías asociado a la edad materna, aunque la utilización de este criterio como método único en la selección de gestantes presenta una baja sensibilidad. Nuestros resultados confirman esta observación en base al VPP global detectado (1,60%, muy inferior al manifestado en los criterios intragestacionales Marcador ecográfico y Cribado combinado del 1º trimestre) (Tabla 28). Esta apreciación es avalada por la pérdida de sensibilidad obtenida en el último quinquenio analizado (Tabla 29), disminuyendo el VPP a una tasa de 1,13% y afín a la bibliografía consultada (*Cuckle H., 2005; Drugan et al.,*

2005), no obstante estas cifras no han mostrado diferencias significativas con el quinquenio anterior (Tabla 29). Los trabajos de *Nishiyama et al., 2015*, *Ekin et al., 2014* y *Lichtenbelt et al., 2011* reflejan una disminución en la frecuencia de alteraciones numéricas inversamente proporcional al incremento de detección que se produce una vez implementado el cribado combinado de primer trimestre. De manera específica, el número de cariotipos con trisomía 21 también ha mostrado una disminución en el último periodo analizado aunque no hemos detectado significación estadística (Tabla 29).

Al contrario de las aneuploidías, no se ha observado una asociación significativa de los RCEs *de novo* con la edad materna (*Forobosco et al., 2009*); esta característica ha sido también apreciada en nuestro trabajo al comparar la frecuencia de estas alteraciones entre las indicaciones Ansiedad materna y Edad materna avanzada ($p=0,731$) (Tabla 31). Estas alteraciones han presentado un VPP total del 0,33% (Tabla 28), detectando un ligero incremento en el último quinquenio del estudio (Tabla 30), aunque sin significación estadística.

De manera general, la tasa global de cromosopatías descrita en la indicación Edad materna avanzada, en estudios previos de líquido amniótico, oscila entre 2,2-3,4% (*Mademont-Soler et al., 2011*, *Chang et al., 2012*; *Balkan et al., 2011*; *Ekin et al., 2014*; *Nishiyama et al., 2015*; *Nagel et al., 2007*; *Han et al., 2008*; *Tseng et al., 2006*; *Danisman et al., 2013*), rango en el que se encuentra incluida la frecuencia identificada en nuestro trabajo (2,25%) (Tabla 22); estas cifras son sensiblemente inferiores a las encontradas en Marcador ecográfico y Cribado combinado del 1º trimestre, lo que ha hecho considerar esta indicación obsoleta (*Kim et al., 2013*; *Cuckle H., 2005*; *Drugan et al., 2005*). Otros autores (*Ocak et al., 2014*; *Balkan et al., 2011*) encuentran incidencias del 5,2% y 7,1% respectivamente, debido a la utilización de marcadores bioquímicos en suero materno como método de *screening* sin su inclusión en un procedimiento integrado de cribado

A pesar de la recomendación propuesta por El *American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)*, 2007, que aconseja no utilizar la edad materna como método de selección aislado, el desarrollo y los recursos disponibles en diferentes áreas geográficas no permiten implementar otros métodos de cribado, por lo que el número de procedimientos invasivos en gestantes con edad ≥ 35 años es muy elevado en estos lugares.

La optimización de los criterios de selección de gestantes en riesgo de cromosopatía es un objetivo prioritario para Obstetras y Genetistas en el ámbito del diagnóstico prenatal, siempre en consonancia con el coste-beneficio de la prueba invasiva enfocado al riesgo asociado de pérdida fetal, de manera que este riesgo debe estar equilibrado a la capacidad de detección de patología cromosómica. Aunque algunas referencias en cuanto a la tasa de aborto involuntario parecen mostrar una disminución significativa en los últimos años, producto de la mejora de los equipos de ultrasonidos y la mayor experiencia del operador (*Odibo et al., 2008*; *Eddelman et al., 2006*), un meta-análisis posterior describe una tasa de pérdidas del 0,6% en los primeros 14

días post-amniocentesis, que asciende hasta el 0,9% si se incluye un periodo hasta la 24^a semana gestacional y alcanzando un 1,9% cuando se considera todo el periodo gestacional (*Mujezinovic and Alfirevic, 2007*). Estas cifras son similares a las que nosotros proporcionamos en el consentimiento informado previo a la realización de una amniocentesis, en el cual comunicamos que el riesgo asociado a la prueba oscila entre 0,6-0,9%. Si por otra parte tenemos en cuenta la prevalencia de la patología cromosómica en las gestantes en las que la indicación de la técnica fue simplemente Edad materna avanzada, se llega a la conclusión de que el riesgo de enfermedad supera al de la prueba cuando la edad materna es igual o superior a 40 años (1,96% de anomalías numéricas; 1,26% de RCEs de novo; 3,22% de anomalías totales), mientras que por debajo de este umbral de edad el riesgo de la técnica supera al de la enfermedad (Tabla 32 y Tabla 33). Aun así, hemos observado una disminución en la tasa de detección global de alteraciones numéricas en el grupo de gestantes con edad \geq 40 años, siendo más relevante en el caso de la trisomía 21 (Tabla 32). La disminución de la patología detectada es producto del rendimiento del criterio Cribado combinado del 1^o trimestre. En contraposición hemos observado un incremento en la capacidad de detección de reordenamientos estructurales *de novo* (Tabla 32 Tabla 33).

La capacidad diagnóstica global del criterio “Ansiedad materna” ha sido del 1,20% (Tabla 34). Es importante destacar que en el último periodo del estudio, no hemos detectado alteraciones numéricas ni estructurales en esta indicación, por lo que se debe considerar únicamente como paliativo del *stress* materno.

La tasa de detección de alteraciones cromosómicas en gestantes con Hijo anterior con cromosomopatía *de novo* ha sido del 1,6% (Tabla 36), superior a la referida *Warburton et al., 2004*, trabajo que únicamente recoge tasas para recurrencia de aneuploidías, estableciendo este riesgo en 1%, en consonancia con nuestros resultados (5/499 gestaciones) (Tabla 36). Únicamente el trabajo de *Caron et al., 1999* describe el riesgo de recurrencia para reordenamientos estructurales en estas gestantes (0,5%), en consonancia con la detectada en nuestro trabajo (0,6%) (Tabla 36).

La frecuencia de cromosomopatías en gestaciones remitidas por “Hijo anterior con malformación congénita” e “Historia de abortos de repetición” han sido similar, con un VPP aproximado del 1% (Tabla 37 y Tabla 39). En el primer criterio, las alteraciones numéricas se han considerado consideran hallazgos casuales, mientras que en el segundo, la aneuploidía diagnosticada mostraba una importante repercusión clínica, en consonancia con los resultados reportados para esta indicación. Respecto a los RCEs, no hemos encontrado diferencias en la severidad de las alteraciones, dado que en ambos casos se ha identificado un caso de inversión *de novo*.

6.- CONCLUSIONES

1. A lo largo de los años se ha asistido a un cambio drástico en las indicaciones de amniocentesis, de manera que se ha pasado de trabajar de forma casi exclusiva con indicaciones clínicas como la edad materna, a modelos multiparámétricos, que incluyen marcadores clínicos, bioquímicos y ecográficos.
2. En los últimos años hemos detectado a una disminución en el número de procedimientos invasivos, a lo cual ha contribuido de forma decisiva la optimización de los criterios de selección.
3. Este cambio en las indicaciones ha redundado en una mayor prevalencia de patología citogenética por número de estudios realizados, alcanzando significación estadística, que en el caso de los reordenamientos estructurales ha sido más notoria.
4. La mayor parte de las trisomías 21 detectadas prenatalmente se identifican a través del programa de cribado combinado de aneuploidías en el primer trimestre de la gestación.
5. En el 30% de las gestaciones en las que el resultado citogenético es patológico, tras un cribado combinado de aneuploidías en el primer trimestre de alto riesgo, la alteración cromosómica es diferente a la esperada. Por ello, es necesario realizar un Consejo genético posterior a la detección de un resultado de riesgo en el Cribado combinado de 1º trimestre, para informar de los posible hallazgos citogenéticos tras la amniocentesis, que pueden implicar un manejo gestacional diferente al esperado y una elevada ansiedad en la pareja.
6. Las indicaciones de estudio citogenético con mayor rendimiento diagnóstico son Pareja portadora de reordenamiento estructural y Marcador y/o malformación ecográfica. Estos, sin duda, constituyen la herramienta más eficiente para la identificación de gestantes con riesgo de cromosopatía fetal en ausencia de factores de riesgo preconceptionales.
7. La Edad materna <40 años, como consejo para realizar un procedimiento invasivo, es un criterio que se debe eliminar en los protocolos prenatales, siempre que el grupo de trabajo disponga de métodos de cribado combinado que incluye marcadores ecográficos y bioquímicos.

8. Por el contrario, se debe recomendar la realización de estudio citogenético fetal a las gestantes cuya edad en el momento de la concepción sea ≥ 40 años, dado que la incidencia de patologías no detectables con los programas de cribado actuales, es superior al riesgo estimado de pérdida fetal tras la prueba invasiva.
9. El riesgo de recurrencia de un cariotipo patológico en gestantes remitidas por hijo anterior con alteración cromosómica de novo es del 1,6%.
10. La identificación de una alteración cromosómica requiere una interpretación individualizada de las posibles consecuencias clínicas utilizando la metodología obstétrica y citogenética a nuestro alcance, que nos permita transmitir una información clara y objetiva a las parejas para tomar la decisión más adecuada respecto al embarazo.

7.-BIBLIOGRAFÍA

1. Abele H, Wagner P, Sonek J, Hoopmann M, Brucker S, Artunc-Ulkumen B and Kagan K O. First trimester ultrasound screening for Down syndrome based on maternal age, fetal nuchal translucency and different combinations of the additional markers nasal bone, tricuspid and ductus venosus flow. *Prenatal Diagnosis* 2015; 35: 1–5.
2. Adinolfi M, Pertl B and Sherlock J. Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat Diagn* 1997; 17(13):1299-311. Review.
3. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvi C and D'Antonios F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015; 45: 16–26.
4. Alamillo CML, Krantz D, Evans M, Fiddler M and Pergament E. Nearly a third of abnormalities found after first-trimester screening are different than expected: 10-year experience from a single center. *Prenatal Diagnosis* 2013; 32: 1–6.
5. Alfarawati S, Fragouli E, Colls P and Wells D. Embryos of Robertsonian translocation carriers exhibit a mitotic interchromosomal effect that enhances genetic instability during early development. *PLOS Genetics* 2012; Volume 8 | Issue 10 | e1003025.
6. American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG). Practice Bulletin No. 88: Invasive prenatal testing for aneuploidy. *Obstet Gynecol* 2007; 110:1459–67.
7. American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG). Committee Opinion No. 581: the use of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol.* 2013; 122(6):1374-77.
8. American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG). Practice Bulletins No. 77: Screening for fetal chromosomal abnormalities. *Obstet Gynecol* 2007; 109:217-27.
9. Anger GJ, Crocker S, McKenzie K, Brown KK, Morton CC, Harrison K and MacKenzie JJ. X-linked deafness-2 (DFNX2) phenotype associated with a paracentric inversion upstream of POU3F4. *Am J Audiol* 2014; 23(1):1-6.
10. Anton E, Vidal F, Egozcue J and Blanco J. Preferential alternate segregation in the common t(11;22)(q23;q11) reciprocal translocation: sperm FISH analysis in two brothers. *Reprod Biomed Online.* 2004 Dec; 9(6):637-44.
11. Äyräs O, Tikkanen M, Eronen M, Paavonen J and Stefanovic V. Increased nuchal translucency and pregnancy outcome: a retrospective study of 1063 consecutive singleton pregnancies in a single referral institution. *Prenat Diagn* 2013; 33:856–62.
12. Baldwin EL, May LF, Justice AN, Martin CL and Ledbetter DH. Mechanisms and consequences of small supernumerary marker chromosomes: from Barbara McClintock to modern genetic-counseling issues. *Am J Hum Genet* 2008; 82:398–410.
13. Balicek P. Pericentric inversion of human chromosomes and its risks. *Cas Lek Cesk* 2001; 140: 38-42.
14. Balkan M, Akbas H, Isi H, Oral D, Turkyilmaz A, Kalkanli S, Simsek S, Fidanboy M, Alp MN, Gedik A and Budak T. Cytogenetic analysis of 4216 patients referred for suspected chromosomal abnormalities in Southeast Turkey. *Genet Mol Res* 2010; Jun 11; 9(2):1094-103.

15. Balkan M, Akbas H, Kalkanli S, Sakar MN, Fidanboy M, Alp MN and Budak T. Evaluation of clinical and cytogenetic finding on 1.068 second trimester amniocentesis in Southeast Turkey. *Clin Exp Obst & Gyn* 2011; 38(4):364-68.
16. Balkan M, Isi H, Gedik A, Erdemoğlu M and Budak T. A small supernumerary marker chromosome, derived from chromosome 22, possibly associated with repeated spontaneous abortions. *Genet Mol Res.* 2010; 24; 9(3):1683-89.
17. Ballif BC, Sulpizio SG, Lloyd RM, Minier SL, Theisen A, Bejjani BA, Shaffer LG. The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array CGH. *Am J Med Genet A* 2007; 143 A (16):1850-7.
18. Ballif BC, Rorem EA, Sundin K, Lincicum M, Gaskin S, Coppinger J, Kashork CD, Shaffer LG, Bejjani BA. Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. *Am J Med Genet A* 2006; 140(24):2757-67.
19. Bandyopadhyay R, Berend SA, Page SL, Choo KH and Shaffer LG. Satellite III sequences on 14p and their relevance to Robertsonian translocation formation. *Chromosome Res* 2001a; 9:235–42.
20. Bandyopadhyay R, Heller A, Knox-DuBois C, McCaskill C, Berend SA, Page SL and Shaffer LG. Parental origin and timing of de novo Robertsonian translocation formation. *Am J Hum Genet* 2002; 71:1456–62.
21. Bandyopadhyay R, McQuillan C, Page SL, Choo KH and Shaffer LG. Identification and characterization of satellite III subfamilies to the acrocentric chromosomes. *Chromosome Res* 2001b; 9:223-33.
22. Bantock H and Sutherland I. Risks of amniocentesis. *Lancet* 1979; 13; 2(8146):788.
23. Beaudet AL. Ethical issues raised by common copy number variants and single nucleotide polymorphisms of certain and uncertain significance in general medical practice. *Genome Med* 2010; Jul 17; 2(7):42.
24. Benacerraf BR, Cnann A, Gelman R, Laboda LA and Frigoletto FD Jr. Can sonographers reliably identify anatomic features associated with Down syndrome in fetuses?. *Radiology* 1989; 173(2):377-80.
25. Benacerraf BR, Frigoletto FD and Cramer DW Jr. Down syndrome: sonographic sign for diagnosis in the second-trimester fetus. *Radiology* 1987. 163: 811–13.
26. Benacerraf BR, Frigoletto FD Jr and Laboda LA. Sonographic diagnosis of Down syndrome in the second trimester. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 1; 153(1):49-52.
27. Benacerraf BR, Neuberger D, Frigoletto FD Jr... Humeral shortening in second-trimester fetuses with Down syndrome. *Obstet Gynecol.* 1991 Feb; 77(2):223-7.
28. Benacerraf BR1, Laboda LA and Frigoletto FD. Thickened nuchal fold in fetuses not at risk for aneuploidy. *Radiology* 1992; 184(1):239-42.
29. Benn P, Borrell A, Crossley J, Cuckle H, Dugoff L, Gross S, Johnson JA, Maymon R, Odibo A, Schielen P, Spencer K, Wright D, Yaron Y; International Society for Prenatal Diagnosis. Aneuploidy screening: a position statement from a committee on behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis, January 2011. *Prenat Diagn.* 2011; 31(6):519-22.

30. Bocian E, Suchenek K, Obersztyn E, Nowakowska B and Mazurczak T. Recombination aneusomy of subtelomeric regions of chromosome 5, resulting from a large familial pericentric inversion inv(5)(p15.33q35.3). *J Appl Genet* 2005; 46:109-14.
31. Bonaglia MC, Giorda R, Tenconi R, Pessina M, Pramparo T, Borgatti R and Zuffardi O. A 2.3 Mb duplication of chromosome 8q24.3 associated with severe mental retardation and epilepsy detected by standard karyotype. *Eur J Hum Genet* 2005; 13(5):586-91.
32. Borenstein M, Cavoretto P, Allan L, Huggon I and Nicolaides KH. Aberrant right subclavian artery at 11 + 0 to 13 + 6 weeks of gestation in chromosomally normal and abnormal fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008 ;31(1):20-4.
33. Borenstein M, Persico N, Strobl I, Sonek J and Nicolaides KH. Frontomaxillary and mandibulomaxillary facial angles at 11 + 0 to 13 + 6 weeks in fetuses with trisomy 18. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007; 30(7):928-33.
34. Borgaonkar DS. *Chromosomal Variation in Man. A Catalog of Chromosomal Variants and Anomalies*. New York: Wiley-Liss, Inc. 1997.
35. Borrell A, Casals E, Fortuny A, Farre MT, Gonce A, Sanchez A, Soler A, Cararach V and Vanrell JA. First-trimester screening for trisomy 21 combining biochemistry and ultrasound at individually optimal gestational ages. An interventional study. *Prenat Diagn* 2004; 24(7):541-45.
36. Bossolasco P, Montemurro T, Cova L, Zangrossi S, Calzarossa C, Buiatitot S, Soligo D, Bosari S, Silani V, Deliliers GL, Rebulli P and Lazzari L. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res* 2006; Apr 16(4):329-36.
37. Boyd PA, Loane M, Garne E, Khoshnood B, Dolk H; EUROCAT working group. Sex chromosome trisomies in Europe: prevalence, prenatal detection and outcome of pregnancy. *Eur J Hum Genet* 2011; 19:231-34.
38. Brambati and Simoni. Diagnosis of fetal trisomy 21 in first Trimester. *Lancet*. 1983; March 12, p.586.
39. Brambati B, Macintosh MC, Teisner B, Maguiness S, Shrimanker K, Lanzani A, Bonacchi I, Tului L, Chard T and Grudzinskas JG. Low maternal serum levels of pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) in the first trimester in association with abnormal fetal karyotype. *Br J Obstet Gynaecol* 1993; Apr 100(4):324-26.
40. Brock DJ and Sutcliffe RG. Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. *Lancet*. 1972; 29;2(7770):197-99.
41. Brock JA, Dyack S, Ludman M, Dumas N, Gaudet M and Morash B. Mosaic tetrasomy 5p resulting from an isochromosome 5p Marker Chromosome: Case Report and Review of Literature. *Am J Med Genet Part A* 2012; 158A: 406–411.
42. Bromley B, Frigoletto FD Jr, Harlow BL, Evans JK and Benacerraf BR. Biometric measurements in fetuses of different race and gender. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1993; 1; 3(6):395-402.
43. Bromley B, Lieberman E, Laboda L and Benacerraf BR. Echogenic intracardiac focus: a sonographic sign for fetal Down syndrome. *Obstet Gynecol* 1995; 86(6):998-1001.
44. Bromley B, Lieberman E, Shipp TD and Benacerraf BR. The genetic sonogram: a method of risk assessment for Down syndrome in the second trimester. *J Ultrasound Med* 2002; 21(10):1087-96.

45. Brown KW, Gardner A, Williams JC, Mott MG, McDermott A and Maitland NJ. Paternal origin of 11p15 duplications in the Beckwith-Wiedemann syndrome. A new case and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 58(1):66-70.
46. Brun JL, Gangbo F, Wen ZQ, Galant K, Taine L, Maugey-Laulom B, Roux D, Mangione R, Horovitz J and Saura R. Prenatal diagnosis and management of sex chromosome aneuploidy: a report on 98 cases. *Prenat Diagn* 2004; 24(3):213-8.
47. Bugge M, Bruun-Petersen G, Brøndum-Nielsen K, Friedrich U, Hansen J, Jensen G, Jensen PK, Kristoffersson U, Lundsteen C, Niebuhr E, Rasmussen KR, Rasmussen K and Tommerup N. Disease associated balanced chromosome rearrangements: a resource for large scale genotype-phenotype delineation in man. *J Med Genet* 2000; 37(11):858-65.
48. Callen DF, Mulley JC, Baker EG and Sutherland GR. Determining the origin of human X isochromosomes by use of DNA sequence polymorphisms and detection of an apparent i(Xq) with Xp sequences. *Hum Genet.* 1987 Nov; 77(3):236-40.
49. Campana M, Serra A and Neri G. Role of chromosome aberrations in recurrent abortion: a study of 269 balanced translocations. *Am J Med Genet* 1986; 24(2):341-56.
50. Canick JA, Knight GJ, Palomaki GE, Haddow JE, Cuckle HS and Wald NJ. Low second trimester maternal serum unconjugated estriol in pregnancies with Down's syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 1988; Apr 95(4):330-33.
51. Caron L, Tihy F and Dallaire L. Frequencies of chromosomal abnormalities at amniocentesis: Over 20 Years of Cytogenetic Analyses in One Laboratory. *American Journal of Medical Genetics* 1999; 82:149-54.
52. Casperson T, Zech L, Modest EJ, Foley GE, Wagh U and Simonsson E. Chemical differentiation with fluorescence alkylating agents in vicia faba metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 1969; 58: 128-140.
53. Cederholm M, Haglund B and Axelsson O. Infant morbidity following amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal karyotyping. *BJOG* 2005; 112:394-402.
54. Chandley AC. On the parental origin of de novo mutation in man. *J Med Genet* 1991; 28: 217-23.
55. Chang YW, Chang CM, Sung PL, Yang MJ, Li WH, Li HY, Chen LC, Cheng LY, Lai YL, Cheng YY,
56. Chang WH, Chao KC and Wang PH. An overview of a 30-year experience with amniocentesis in a single tertiary medical center in Taiwan. *Taiwan J Obstet & Gynecol* 2012; 51:206-11.
57. Chaoui R, Heling KS, Sarioglu N, Schwabe M, Dankof A and Bollmann R. Aberrant right subclavian artery as a new cardiac sign in second- and third-trimester fetuses with Down syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 257-63.
58. Chaoui R, Rake A and Heling KS. Aortic arch with four vessels: aberrant right subclavian artery. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 31:115-17.
59. Chen CP, Huang JP, Chen YY, Chern SR, Wu PS, Su JW, Chen YT, Chen WL and Wang W. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome: prenatal diagnosis, array comparative genomic hybridization characterization using uncultured amniocytes and literature review. *Gene* 2013; 527(1):405-09.
60. Chitty L. The evolution of prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2010; 30: 599-600.

61. Cicero S, Bindra R, Rembouskos G, Spencer K and Nicolaides KH. Integrated ultrasound and biochemical screening for trisomy 21 using fetal nuchal translucency, absent fetal nasal bone, free beta-hCG and PAPP-A at 11 to 14 weeks. *Prenat Diagn* 2003; 23(4):306-10.
62. Cicero S, Curcio P, Papageorgiou A, Sonek J and Nicolaides K. Absence of nasal bone in fetuses with trisomy 21 at 11-14 weeks of gestation: an observational study. *Lancet* 2001; 17;358(9294):1665-67.
63. Cirigliano V, Lewin P, Szpiro-Tapies S, Fuster C and Adinolfi M. Assessment of new markers for the rapid detection of aneuploidies by quantitative fluorescent PCR (QF-PCR). *Ann Hum Genet* 2001; 65:421-27.
64. Coghlan JP, Aldred P, Haralambidis J, Niall HD, Penschow JD and Tregear GW. Hybridization histochemistry. *Anal Biochem* 1985; 15; 149(1):1-28.
65. Cohen O, Cans C, Cuillel M, Gilardi JL, Roth H, Mermet MA, Jalbert P and Demongeot J. Cartographic study: breakpoints in 1574 families carrying human reciprocal translocations. *Hum Genet* 1996; 97(5):659-67.
66. Comas C, Echevarria M, Rodríguez I, Serra B and Cirigliano V. Prenatal invasive testing: a 13-year single institution experience. *J Matern Fetal Neonatal Med* 201; 27(12):1209-12.
67. Cote GB, Katsantoni A, Deligeorgis D. The cytogenetic and clinical implications of a ring chromosome 2. *Ann Genet* 1981; 24(4):231-35.
68. Crolla JA, Youings SA, Ennis S and Jacobs PA. Supernumerary marker chromosomes in man: parental origin, mosaicism and maternal age revisited. *Eur J Hum Genet* 2005; 13(2):154–60.
69. Cuckle HS, Holding S, Jones R, Groome NP and Wallace EM. Combining inhibin A with existing second-trimester markers in maternal serum screening for Down's syndrome. *Prenat Diagn* 1996; 16:1095-100.
70. Cuckle HS, Spencer K and Nicolaides KH. Down syndrome screening marker levels in women with a previous aneuploidy pregnancy. *Prenat Diagn* 2005; 25(1):47-50.
71. Daffos F, Capella-Pavlovsky M and Forestier F. Direct collection of fetal blood from the umbilical vein under echography. First results, prospects. *Presse Med.* 1983 Apr 9; 12(16):1017.
72. Danisman N, Kahyaoglu S, Celen S, Kahyaoglu I, Candemir Z, Yesilyurt A and Cakar ES. A retrospective analysis of amniocenteses performed for advanced maternal age and various other indications in Turkish women. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013; Feb 26(3):242-45.
73. De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, Novara F, Vetro A, Rossi E, Maraschio P, Bonaglia MC, Anichini C, Ferrero GB, Silengo M, Fazzi E, Zatterale A, Fischetto R, Previderé C, Belli S, Turci A, Calabrese G, Bernardi F, Meneghelli E, Riegel M, Rocchi M, Gueneri S, Lalatta F, Zelante L, Romano C, Fichera M, Mattina T, Arrigo G, Zollino M, Giglio S, Lonardo F, Bonfante A, Ferlini A, Cifuentes F, Van Esch H, Backx L, Schinzel A, Vermeesch JR and Zuffardi O. Cryptic deletions are a common finding in “balanced” reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet* 2007; 44:750–62.
74. De Souza E, Halliday J, Chan A, Bower C and Morris JK. Recurrence risks for trisomies 13, 18, and 21. *Am J Med Genet A* 2009; 149A(12):2716-22.

75. Devriendt K, Fryns JP, Mortier G, van Thienen MN and Keymolen K. The annual incidence of DiGeorge/velocardiofacial syndrome. *J Med Genet* 1998; 35:789–90.
76. Dildy GA, Judd VE and Clark SL. Prospective evaluation of the antenatal incidence and postnatal significance of the fetal echogenic cardiac focus: a case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175(4 Pt 1):1008-12.
77. Documento de Consenso para la Implementación de los Arrays. [CGH y SNP-arrays] en la Genética Clínica. 2012; Ed. DrugFarma. http://contenidos.instituto-roche.es/pdf/2012/consenso_arrays.pdf.
78. Donald and Brown. Localization using physical devices, radioisotopes and radiographic methods. *British Journal of Radiology* 1961; volume 34, September nº 405: 539-46.
79. Down JLH. Observations on an Ethnic classification of idiots. *London Hospital Reports* 1866; 3:259-262.
80. Drugan A. Advanced maternal age and prenatal diagnosis: it's time for individual assessment of genetic risks. *Isr Med Assoc J.* 2005; 7:99–102.
81. Dufke A, Mayrhofer H, Enders H, Kaiser P and Leipoldt M. Unusual chromosomal mosaicism as a cause of mental retardation and congenital malformations in a familial reciprocal translocation carrier, t(17;22)(q24.2;q11.23). *Cytogenet Cell Genet* 2001; 93(3-4):168-70.
82. Dupont C, Defebvre MM, Vérité E et Cerf E. Prenatal diagnosis in the Nord-Pas-de-Calais in 2004: organisational issues and challenges. *Sante Publique* 2007; 19(3):183-91.
83. Durmaz B, Karaca E, Durmaz A, Atik T, Akin H, Cogulu O and Ozkinay F. Subtelomeric rearrangements in patients with idiopathic intellectual disability/ multiple congenital anomalies and recurrent miscarriages: seven years' experience. *Genet Couns* 2013; 24(2):167-77.
84. Eddleman KA, Malone FD, Sullivan L, Dukes K, Berkowitz RL, Kharbutli Y, Porter TF, Luthy DA, Comstock CH, Saade GR, Klugman S, Dugoff L, Craigo SD, Timor-Tritsch IE, Carr SR, Wolfe HM and D'Alton ME. Pregnancy loss rates after midtrimester amniocentesis. *Obstet Gynecol* 2006; 108:1067-72.
85. Edwards JH, Harnden DG, Cameron AH, Crosse VM, Wolff OH. A new trisomic syndrome. *Lancet* 1960; 9; 1(7128):787-90.
86. Ekin A, Gezer C, Taner CE, Ozeren M, Avci ME, Uyar I and Ertas IE. Cytogenetic analysis of 6,142 amniocentesis cases: A 6-year single centre experience. *J Obstet Gynaecol* 2014; Oct 34(7):571-75.
87. Engels MA, Bholá SL, Twisk JW, Blankenstein MA and van Vugt JM. Evaluation of the introduction of the national Down syndrome screening program in the Netherlands: age-related uptake of prenatal screening and invasive diagnostic testing. *Eur J Obstet Gynecol and Reprod Biol* 2014; 174:59–63.
88. Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM, Dawson DB, Thorland EC, Lorentz CP, Goldstein JL, McDonald MT, Smith WE, Simon-Fayard E, Alexander AA, Kulharya AS, Ketterling RP, Clark RD and Jalal SM. Microduplication 22q11.2, an emerging syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet* 2003; Nov 73(5):1027-40.

89. Esen FM. Congenital heart malformations in mongolism with special reference to ostium atrioventriculare commune. *Arch Pediatr* 1957; 74:243–277.
90. Faas BH, van der Burgt I, Kooper AJ, Pfundt R, Hehir-Kwa JY, Smits AP and de Leeuw N. Identification of clinically significant, submicroscopic chromosome alterations and UPD in fetuses with ultrasound anomalies using genome-wide 250k SNP array analysis. *J Med Genet* 2010; Sep 47(9):586-94.
91. Faiola S, Tsoi E, Huggon IC, Allan LD and Nicolaidis KH. Likelihood ratio for trisomy 21 in fetuses with tricuspid regurgitation at the 11 to 13 + 6-week scan. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005; Jul 26(1):22-7.
92. Falcon O, Faiola S, Huggon I, Allan L and Nicolaidis 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(6):609-12.
93. Farkas LG, Katic MJ, Forrest CR and Litsas L. Surface anatomy of the face in Down's syndrome: linear and angular measurements in the craniofacial regions. *J Craniofac Surg.* 2001b; Jul 12(4):373-9; discussion 380.
94. Farkas LG, Katic MJ, Forrest CR. Surface anatomy of the face in Down's syndrome: anthropometric proportion indices in the craniofacial regions. *J Craniofac Surg.* 2001a; Nov 12(6):519-24; discussion 525-26.
95. Ferfourri F, Clement P, Gomes DM, Minz M, Amar E, Selva J and Vialard F. Is classic pericentric inversion of chromosome 2 inv(2)(p11q13) associated with an increased risk of unbalanced chromosomes?. *Fertil Steril* 2009; Oct 92(4):1497.e1-4.
96. Ferguson-Smith MA and Yates JR. Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: Report of a collaborative European study on 52.965 amniocenteses. *Prenat Diagn* 1984; 4:5-44.
97. Ferguson-Smith MA. Prospective data on risk of Down syndrome in relation to maternal age. *Lancet* 1976; Jul 31; 2(7979):252.
98. Fiorentino F and Baldi M. Re: Microarray application in prenatal diagnosis: a position statement from the cytogenetics working group of the Italian Society of Human Genetics (SIGU), November 2011. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2012; 39(5):601-2; author reply 604-6.
99. Fiorentino F, Caiazzo F, Napolitano S, Spizzichino L, Bono S, Sessa M, Nuccitelli A, Biricik A, Gordon A, Rizzo G, Baldi M. Introducing array comparative genomic hybridization into routine prenatal diagnosis practice: a prospective study on over 1000 consecutive clinical cases. *Prenat Diagn* 2011; 31(13):1270-82.
100. FitzSimmons J, Droste S, Shepard TH, Pascoe-Mason J, Chinn A and Mack LA. Long-bone growth in fetuses with Down syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1989; Nov 161(5):1174-77.
101. Footz TK, Brinkman-Mills P, Banting GS, Maier SA, Riazi MA, Bridgland L, Hu S, Birren B, Minoshima S, Shimizu N, Pan H, Nguyen T, Fang F, Fu Y, Ray L, Wu H, Shaull S, Phan S, Yao Z, Chen F, Huan A, Hu P, Wang Q, Loh P, Qi S, Roe BA, McDermid HE. Analysis of the cat eye syndrome critical region in humans and the region of conserved synteny in mice: a search for

- candidate genes at or near the human chromosome 22 pericentromere. *Genome Res.* 2001; Jun 11(6):1053-70.
102. Forabosco A, Percesepe A and Santucci S. Incidence of non-age-dependent chromosomal abnormalities: a population-based study on 88965 amniocenteses. *Eur J Hum Genet* 2009; 17:897–903.
 103. Ford C, Jones KW, Polani PE, De Almeida JC and Briggs JH. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1959; 4(1):711-13.
 104. Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L and Dallapiccola B. Guidelines for the appropriate use of genetic test in infertile couples. *Eur J Human Genetics* 2002; 10:303-12.
 105. Forrester and Merz. Patterns of chromosomal deletions identified by a birth defects registry, Hawaii, 1986–2003. *Congenital Anomalies* 2007; 47:58–62.
 106. Franssen MT, Korevaar JC, Tjoa WM, Leschot NJ, Bossuyt PM, Knegt AC, Suykerbuyk RF, Hochstenbach R, van der Veen Fm and Goddijn M. Inherited unbalanced structural chromosome abnormalities at prenatal chromosome analysis are rarely ascertained through recurrent miscarriage. *Prenat Diagn* 2008; 28:408–11.
 107. Franssen MT, Korevaar JC, van der Veen F, Leschot NJ, Bossuyt PM and Goddijn M. Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *BMJ* 2006; 332:759e63.
 108. Gardner y Sutherland 2004. *Chromosomes abnormalities and genetic counseling.* (Oxford University Press, New York 2004.
 109. Gardner y Sutherland. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling* (Oxford University Press, New York 1996.
 110. Garne E, Dolk H, Loane M and Boyd PA. EUROCAT website data on prenatal detection rates of congenital anomalies. *J Med Screen* 2010; 17(2):97-8. 18.
 111. Gaudry P, Esvan M, Meynard JB, Lebbar A, Choiset A, Lewin F, Tsatsaris V, Pannier E and Grange G. Amniocentesis Performed for Karyotyping after Identified Ultrasonographic Abnormalities: What to Expect?. *Fetal Diagn Ther* 2012; 31:55–62.
 112. Gekas J, Thepot F, Turleau C, Siffroi JP, Dadoune JP, Briault S, Rio M, Bourouillou G, Carré-Pigeon F, Wasels R and Benzacken B. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod* 2001; 16(1):82-89.
 113. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munné S, Balicchia B, Escudero T and Crippa A. Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Reprod* 2002; 12:3201–07.
 114. Giardino D, Corti C, Ballarati L, Colombo D, Sala E, Villa N, Piombo G, Pierluigi M, Faravelli F, Gueneri S, Coviello D, Lalatta F, Cavallari U, Bellotti D, Barlati S, Croci G, Franchi F, Savin E, Nocera G, Amico FP, Granata P, Casalone R, Nutini L, Lisi E, Torricelli F, Giussani U, Facchinetti B, Guanti G, Di Giacomo M, Susca FP, Pecile V, Romitti L, Cardarelli L, Racalbuto E, Police MA, Chiodo F, Rodeschini O, Falcone P, Donti E, Grimoldi MG, Martinoli E, Stioui S, Caufin D,

- Lauricella SA, Tanzariello SA, Voglino G, Lenzini E, Besozzi M, Larizza L and Dalprà L. De novo balanced chromosome rearrangements in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2009; 29:257–65.
115. Gimelli G, Pujana MA, Patricelli MG, Russo S, Giardino D, Larizza L, Cheung J, Armengol L, Schinzel A, Estivill X and Zuffardi O. Genomic inversions of human chromosome 15q11-q13 in mothers of Angelman syndrome patients with class II (BP2/3) deletions. *Hum Mol Genet* 2003; 12(8):849-58.
116. Goddijn M, Joosten JH, Knecht AC, van derVeen F, Franssen MT, Bonse GJ and Leschot NJ. Clinical relevance of diagnosing structural chromosome abnormalities in couples with repeated miscarriage. *Hum Reprod* 2004; 19(4):1013-17.
117. Griffin DK, Abruzzo MA, Millie EA, Feingold E and Hassold TJ. Sex ratio in normal and disomic sperm: evidence that the extra chromosome 21 preferentially segregates with the Y chromosome. *Am J Hum Genet* 1996; 59:1108–13.
118. Guilherme RS, Meloni VF, Kim CA, Pellegrino R, Takeno SS, Spinner NB, Conlin LK, Christofolini DM, Kulikowski LD and Melaragno MI. Mechanisms of ring chromosome formation, ring instability and clinical consequences. *Med Genet* 2011; 12:171. <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/12/171>.
119. Gupta G, Aggarwal S and Phadke SR Intracardiac echogenic focus and fetal outcome. *J Clin Ultrasound*. 2010; 38(9):466-69.
120. Halliday JL, Watson LF, Lumley J, Danks DM and Sheffield LJ. New estimates of Down syndrome risks at chorionic villus sampling, amniocentesis, and livebirth in women of advanced maternal age from a uniquely defined population. *Prenat Diagn* 1995; 15(5):455-65.
121. Hamerton JL, Canning N, Ray M and Smith S. A cytogenetic survey of 14,069 newborn infants. I. Incidence of chromosome abnormalities. *Clin Genet* 1975; 4:223-43.
122. Han SH, An JW, Jeong GY, Yoon HR, Lee A, Yang YH, Lee KP and Lee KR. Clinical and Cytogenetic Findings on 31,615 Mid-trimester Amniocenteses. *Korean J Lab Med* 2008; 28:378-85.
123. Harbison M, Hassold T, Kobryn C and Jacobs PA. Molecular studies of the parental origin and nature of human X isochromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1988; 47(4):217-22.
124. Hartmann A, Hofmann UB, Hoehn H, Broecker EB, Hamm H. Postnatal confirmation of prenatally diagnosed trisomy 20 mosaicism in a patient with linear and whorled nevoid hypermelanosis. *Pediatr Dermatol* 2004; 21(6):636-41. Review.
125. Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM and Ira G. Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet* 2009; 10(8):551-64.
126. Hastings R, Howell R, Bricarelli FD, Kristoffersson U and Simona Cavani. EQA (European Quality Assurance). European Cytogeneticists Association.No. 29, January 2012.
127. Hastings RJ, Cavani S, Bricarelli FD, Patsalis PC, Kristoffersson U; ECA PWG Co-ordinators. Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance: a common European framework for quality assessment for constitutional and acquired cytogenetic investigations. *Eur J Hum Genet*. 2007; 15(5):525-27.
128. Hillman SC, Pretlove S, Coomarasamy A, McMullan DJ, Davison EV, Maher ER and Kilby MD. Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional

- karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011; 37:6–14.
129. Hinton RB Jr, Deutsch GH, Pearl JM, Hobart HH, Morris CA, Benson DW. Bilateral semilunar valve disease in a child with partial deletion of the Williams-Beuren syndrome region is associated with elastin haploinsufficiency. *J Heart Valve Dis* 2006; 15(3):352-55.
 130. Hirshfeld-Cytron J, Sugiura-Ogasawara M and Stephenson MD. Management of recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a reciprocal translocation: a systematic review. *Semin Reprod Med* 2011; 29(6):470-81.
 131. Hoehn H and Salk D. Morphological and biochemical heterogeneity of amniotic fluid cells in culture. *Methods Cell Biol* 1982; 26:11-34. Review.
 132. Hoffman, JI. Incidence of congenital heart disease: II. Prenatal incidence. *Pediatr. Cardiol.* 1995; 16, 155–65.
 133. Hogge WA, Byrnes AL, Lanasa MC and Surti U. The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189(2):397-400; discussion 400-2.
 134. Honda H, Miharu N, Samura O, He H and Ohama K. Meiotic segregation analysis of a 14;21 Robertsonian translocation carrier by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 2000; 106(2):188-93.
 135. Hook EB and Chambers GM .Estimated rates of Down syndrome in live births by one year maternal age intervals for mothers aged 20-49 in New York State study-implications of the risk figures for genetic counseling and cost-benefit analysis of prenatal diagnosis programs. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1977; 13(3A):123-41.
 136. Hook EB and Regal RR. A search for a paternal-age effect upon cases of 47, +21 in which the extra chromosome is of paternal origin. *Am J Hum Genet* 1984; 36(2):413-21.
 137. Hook EB, Cross PK, Regal RR. The frequency of 47, +21, 47, +18, and 47, +13 at the uppermost extremes of maternal ages: results on 56,094 fetuses studied prenatally and comparisons with data on livebirths. *Hum Genet.* 1984; 68(3):211-20.
 138. Huggon IC, DeFigueiredo DB and Allan LD. Tricuspid regurgitation in the diagnosis of chromosomal anomalies in the fetus at 11-14 weeks of gestation. *Heart.* 2003; 89(9):1071-73.
 139. Hunter LE and Simpson JM. Prenatal screening for structural congenital heart disease. *Nat Rev Cardiol.* 2014 Jun;11(6):323-34.
 140. Jackson JM, Crider KS, Rasmussen SA, Cragan JD and Olney RS. Trends in Cytogenetic Testing and Identification of Chromosomal Abnormalities among Pregnancies and Children with Birth Defects, Metropolitan Atlanta, 1968–2005. *Am J Med Genet A* 2012; 158A (1):116-23.
 141. Jacobs PA and Strong JA. Klinefelter syndrome. *Nature* 1959; 183:302.
 142. Jacobson CB and Barter RH, Intrauterine diagnosis and management of genetic defects. *Am J Obstet Gynecol* 1967; 15; 99(6):796-807.
 143. John HA, Birnstiel ML and Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 1969; 9; 223(5206):582-87.
 144. Johnson JM, Wilson RD, Singer J, Winsor E, Harman C, Armson BA, Benzie R, Dansereau J, Ho MF, Mohide P, Natale and Okun N. Canadian Early and Mid-trimester amniocentesis trial Group.

- Technical factors in early amniocentesis predict adverse outcome. Results of the Canadian Early (EA) versus Mid-trimester (MA) Amniocentesis Trial. *Prenat Diagn* 1999; 9(8):732-38.
145. Kagan KO, Cicero S, Staboulidou I, Wright D and Nicolaides KH. Fetal nasal bone in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11-13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009b; 33(3):259-64.
 146. Kagan KO, Etchegaray A, Zhou Y, Wright D and Nicolaides KH. Prospective validation of first-trimester combined screening for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009a; 34(1):14-8.
 147. Kagan KO, Frisova V, Nicolaides KH, Spencer K. Dose dependency between cigarette consumption and reduced maternal serum PAPP-A levels at 11-13+6 weeks of gestation. *Prenat Diagn* 2007; 27(9):849-53.
 148. Kagan KO, Valencia C, Livanos P, Wright D and Nicolaides KH. Tricuspid regurgitation in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11+0 to 13+6 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009; 33(1):18-22.
 149. Kagan KO, Wright D, Spencer K, Molina FS and 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(5):493-502.
 150. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F and Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258(5083):818-21.
 151. Kalousek DK and Vekemans M. Confined placental mosaicism. *J Med Genet* 1996; 33(7):529-33. Review.
 152. Kalousek DK, Langlois S, Robinson WP, Telenius A, Bernard L, Barrett IJ, Howard-Peebles PN and Wilson RD. Trisomy 7 CVS mosaicism: pregnancy outcome, placental and DNA analysis in 14 cases. *Am J Med Genet* 1996a; 65(4):348-52.
 153. Karaoguz MY, Bal F, Yakut T, Ercelen NO, Ergun MA, Gokcen AB, Biri AA, Kimya Y, Urman B, Gultomruk M, Egeli U and Menevse S. Cytogenetic results of amniocentesis materials: Incidencia of abnormal karyotypes in the Turkish collaborative study. *Genet Couns* 2006; 17(2):219-30.
 154. Kasprzak L1, Der Kaloustian VM, Elliott AM, Shevell M, Lejtenyi C and Eydoux P. Deletion of 22q11 in two brothers with different phenotype. *Am J Med Genet* 1998; 75(3):288-91.
 155. Kazy Z, Sztigár AM and Báchárev VA. Chorionic biopsy under immediate real-time (ultrasonic) control. *Orv Hetil.* 1980; 121(45):2765-66.
 156. Keymolen K, Van Berkel K, Vorrsselmans A, Staessen C and Liebaers I. Pregnancy Outcome in Carriers of Robertsonian Translocations. *Am J Med Genet Part A* 2011; 155: 2381-85.
 157. Kidd JM, Cooper GM, Donahue WF, Hayden HS, Sampas N, Graves T, Hansen N, Teague B, Alkan C, Antonacci F, Haugen E, Zerr T, Yamada NA, Tsang P, Newman TL, Tüzün E, Cheng Z, Ebling HM, Tusneem N, David R, Gillett W, Phelps KA, Weaver M, Saranga D, Brand A, Tao W, Gustafson E, McKernan K, Chen L, Malig M, Smith JD, Korn JM, McCarroll SA, Altshuler DA, Peiffer DA, Dorschner M, Stamatoyannopoulos J, Schwartz D, Nickerson DA, Mullikin JC, Wilson

- RK, Bruhn L, Olson MV, Kaul R, Smith DR and Eichler EE. Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature*. 2008; 453(7191):56-64.
158. Kim SR and Shaffer LG. Robertsonian translocations: mechanisms of formation, aneuploidy, and uniparental disomy and diagnostic considerations. *Genet Test* 2002; 6:163–68.
159. Kim YJ, Lee JE, Kim SH, Shim SS and Cha DH. Maternal age-specific rates of fetal chromosomal abnormalities in Korean pregnant women of advanced maternal age. *Obstet Gynecol Sci* 2013; 56(3):160-66.
160. Kjaergaard S, Sundberg K, Jørgensen FS, Rohde MD, Lind AM, Gerdes T, Tabor A and Kirchhoff M. Diagnostic yield by supplementing prenatal metaphase karyotyping with MLPA for microdeletion syndromes and subtelomere imbalances. *Prenat Diagn* 2010; 30(10):995-99.
161. Kleinjan DJ and van Heyningen V. Position effect in human genetic disease. *Hum Mol Genet* 1998; 7(10):1611-18. Review.
162. Kochhar PK and Ghosh F. Reproductive outcome of couples with recurrent miscarriage and balanced chromosomal abnormalities. *J Obstet Gynaeco Res* 2013; 39(1):113–20.
163. Kohatsu M, Carvalho MH, Vieira Francisco RP, Amorim Filho AG and Zugaib M. Analysis of fetal and maternal results from fetal genetic invasive procedures: an exploratory study at a University Hospital. *Revista da Associacao Medica Brasileira* 2012; 58:703– 08.
164. Kotzot D, Martinez MJ, Bagci G, Basaran S, Baumer A, Binkert F, Brecevic L, Castellan C, Chrzanowska K, Dutly F, Gutkowska A, Karaüzüm SB, Krajewska-Walasek M, Luleci G, Miny P, Riegel M, Schuffenhauer S, Seidel H, Schinzel A. Parental origin and mechanisms of formation of cytogenetically recognisable de novo direct and inverted duplications. *J Med Genet* 2000; 37(4):281-6.
165. Kowalczyk M, Srebniak M and Tomaszewska A. Chromosome abnormalities without phenotypic consequences, *J Appl Genet* 2007; 48(2):157-66.
166. Kuo PL and Guo HR. Mechanism of recurrent spontaneous abortions in women with mosaicism of X-chromosome aneuploidies. *Fertil Steril* 2004; 82(6):1594-601.
167. Landegent JE, Jasen in de Wal N, Baan RA, Hoeijmakers JH and Van der Ploeg M. 2-Acetylaminofluorene-modified probes for the indirect hybridocytochemical detection of specific nucleic acid sequences. *Exp Cell Res* 1984; 153(1):61-72
168. Le Caignec C, Boceno M, Jacquemont S and Nguyen The Tich S, Rival JM, David A. Inherited ring chromosome 8 without loss of subtelomeric sequences. *Ann Genet* 2004; 47(3):289-96.
169. Ledbetter DH, Martin AO, Verlinsky Y, Pergament E, Jackson L, Yang-Feng T, Schonberg SA, Gilbert F, Zachary JM and Barr M. Cytogenetic results of chorionic villus sampling: high success rate and diagnostic accuracy in the United States collaborative study. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162(2):495-501.
170. Lee C, Lafrate AJ and Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet* 2007; 39(7 Suppl):S48-54. Review.
171. Lejeune J, Turpin R, Gautier M. Chromosomic diagnosis of mongolism. *Arch Fr Pediat*. 1959; 16:962-3.

172. Liao HM, Fang JS, Chen YJ, Wu KL, Lee KF and Chen CH. Clinical and molecular characterization of a transmitted reciprocal translocation t(1;12)(p32.1;q21.3) in a family co-segregating with mental retardation, language delay, and microcephaly. *BMC Med Genet* 2011; 12:70.
173. Lichtenbelt KD, Alizadeh BZ, Scheffer PG, Stoutenbeek P, Schielen P, Page-Christiaens LC and Schuring-Blom GH. Trends in the utilization of invasive prenatal diagnosis in The Netherlands during 2000–2009. *Prenat Diagn* 2011; 31: 765–772.
174. Liehr T and Weise A. Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics. *Int J Mol Med* 2007; 19:719–731.
175. Liehr T, Brude E, Gillissen-Kaesbach G, König R, Mrasek K, von Eggeling F and Starke H. Prader-Willi syndrome with a karyotype 47,XY,+min(15)(pter->q11.1:) and maternal UPD 15--case report plus review of similar cases. *Eur J Med Genet.* 2005 Apr-Jun;48(2):175-81.
176. Liehr T, Claussen U and Starke H. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res.* 2004a;107(1-2):55-67. Review.
177. Liehr T, Ewers E, Hamid AB, Kosyakova N, Voigt M, Weise A and Manvelyan M. Small supernumerary marker chromosomes and uniparental disomy have a story to tell. *J Histochem Cytochem* 2011; 59:842-848.
178. Liehr T, Hickmann G, Kozłowski P, Claussen U and Starke H. Molecular-cytogenetic characterization of the origin and the presence of pericentromeric euchromatin on minute supernumerary marker chromosomes (SMCs). *Chromosome Re.* 2004; 12(3):239-44.
179. Ling EW, Sosuan LC and Hall JC. Congenital anomalies: an increasingly important cause of mortality and workload in a neonatal intensive care unit. *Am J Perinatol* 1991; 8(3):164-69.
180. Lloveras E, Canellas A, Cirigliano V, Català V, Cerdan C and Plaja A. Supernumerary ring chromosome: an etiology for Pallister-Killian syndrome?. *Fetal Diagn Ther* 2013; 34(3):172-75.
181. Lockwood C, Benacerraf B, Krinsky A, Blakemore K, Belanger K, Mahoney M and Hobbins J. A sonographic screening method for Down syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157(4 Pt 1):803-08.
182. Lubinsky MS. Sir A. E. Garrod, congenital heart disease in Down syndrome, and the doctrine of fetal endocarditis. *Am J Med Genet* 1991; 1; 40(1):27-30.
183. Lupski JR. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 1998; 14(10):417-22. Review
184. Macri JN, Kasturi RV, Krantz DA, Cook EJ, Moore ND, Young JA, Romero K and Larsen JW Jr. Maternal serum Down syndrome screening: free beta-protein is a more effective marker than human chorionic gonadotropin. *Am J Obstet Gynecol* 1990; Oct 163(4 Pt 1):1248-53.
185. Mademont-Soler I, Morales C, Clusellas N, Soler A and Sánchez A. Prenatal cytogenetic diagnosis in Spain: analysis and evaluation of the results obtained from amniotic fluid samples during the last decade. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 157(2):156-60.
186. Mainardi PC, Perfumo C, Cali A, Coucourde G, Pastore G, Cavani S, Zara F, Overhauser J, Pierluigi M and Bricarelli FD. Clinical and molecular characterisation of 80 patients with 5p deletion: Genotype-phenotype correlation. *J Med Genet* 2001; 38:151-58.

187. Maiz N, Valencia C, Kagan KO, Wright D and Nicolaidis KH. Ductus venosus Doppler in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11-13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009; 33(5):512-17.
188. Martínez-Fernández ML, MacDonald A, Aceña I, Bermejo-Sánchez E and Martínez-Frías ML. Análisis de alteraciones cromosómicas estructurales y su distribución por cromosomas en la serie de recién nacidos con defectos congénitos del ECEMC. *Bol ECEMC Rev Dismor Epidemiol* 2011; VI (1):66-82.
189. Matias A, Huggon I, Areias JC, Montenegro N and Nicolaidis KH. Cardiac defects in chromosomally normal fetuses with abnormal ductus venosus blood flow at 10-14 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999; 14(5):307-10.
190. Matsui S and Sasaki M. Differential staining of nucleolus organisers in mammalian chromosomes. *Nature* 1973; 16;246(5429):148-50.
191. Matsuyama A, Croce CM and Huebner K. Common fragile genes. *Eur J Histochem.* 2004; 48(1):29-36. Review.
192. McFadyen A, Gledhill J, Whitlow B and Economides D. First trimester ultrasound screening. Carries ethical and psychological implications. *BMJ* 1998; 317(7160):694-95.
193. McIntosh GC, Olshan AF and Baird PA. Paternal age and the risk of birth defects in offspring. *Epidemiology* 1995; 6:282-8.
194. McVey M and Lee SE. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet* 2008; 24(11):529-38. Review.
195. Méndez-Rosado LA, Quiñones O, Molina O, González N, del Sol M, Maceiras L, Bravo Y. Antenatal Cytogenetic Testing in Havana, Cuba. *MEDICC Rev* 2014; 16(3-4):27-34.
196. Merati R, Lovotti M, Norchi S, Teatini A, Tenore AC and Belloni C. Prevalence of fetal left ventricular hyperechogenic foci in a low risk population. *BJOG* 1996; 103(11):1102-04.
197. Merkatz IR, Nitowsky HM, Macri JN and Johnson WE. An association between low maternal serum alpha-fetoprotein and fetal chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148(7):886-94.
198. Michailidis GD and Economides DL. Nuchal translucency measurement and pregnancy outcome in karyotypically normal fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; 17(2):102-05.
199. Midro AT, Wiland E, Panasiuk B, Leśniewicz R and Kurpisz M. Risk evaluation of carriers with chromosome reciprocal translocation t(7;13)(q34;q13) and concomitant meiotic segregation analyzed by FISH on ejaculated spermatozoa. *Am J Med Genet A* 2006; 140(3):245-56.
200. Misawa S, Horiike S, Taniwaki M, Abe T and Takino T. Prefixation treatment with ethidium bromide for high resolution banding analysis of chromosomes from cultured human bone marrow cells. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 22(4):319-29.
201. Mokánszki A, Ujfalusi A, Balogh E, Sümegi A, Antal-Szalmás P, Bazsáné ZK, Molnár Z, Varga A, Sápy T, Jakab A and Oláh É. Meiotic segregation study of a novel t(3;6)(q21;q23) in an infertile man using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Syst Biol Reprod Med* 2012; 58(3):160-64.
202. Monteagudo A and Timor-Tritsch IE. First trimester anatomy scan: pushing the limits. What can we see now? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003; 15(2):131-41. Review.

203. Moore, J.K. and Haber, J.E. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1996; 16:2164–2173.
204. Morales C, Sánchez A, Bruguera J, Margarit E, Borrell A, Borobio V and Soler A. Cytogenetic study of spontaneous abortions using semi-direct analysis of chorionic villi samples detects the broadest spectrum of chromosome abnormalities. *Am J Med Genet A* 2008; 146A:66-70.
205. Morel F, Laudier B, Guerif F, Couet ML, Royere D, De Breakeller M and Douet-Guilbert N. Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in situ hybridization. *Human Reproduction* 2007; 22(1):136–141.
206. Morris JK, Mutton DE and Alberman E. Revised estimates of the maternal age specific live birth prevalence of Down's syndrome. *J Med Screen* 2002; 9:2-6.
207. Morris JK, Wald NJ and Watt HC. Fetal loss in Down syndrome pregnancies. *Prenat Diagn* 1999; 19(2):142-45.
208. Mujezinovic F and Alfirevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2007; 110:687-94.
209. Muller and Young. Chromosomes. In: Urquhart J, Crum R, editors. *Emery's elements of medical genetics*. 10th ed. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone; 1998. p. 48.
210. Murmann AE, Conrad DF, Mashek H, Curtis CA, Nicolae RI, Ober C and Schwartz S. Inverted duplications on acentric markers: mechanism of formation. *Hum Mol Genet* 2009; 18:2241-56.
211. Muss B and Schwanitz G. Characterization of Inversions as a Type of Structural Chromosome Aberration. *Int J Hum Genet* 2007; 7(2):141-61.
212. Myriantopoulos NC. *Malformations in children from one to seven years*. New York: Alan R Liss 1985.
213. Newberger DS. Down syndrome: Prenatal risk assessment and diagnosis. *Am Fam Physician* 2000; 62:825–832, 837–828.
214. Nicolaidis KH, Chervenak FA, McCullough LB, Avgidou K and Papageorgiou A. Evidence-based obstetric ethics and informed decision-making by pregnant women about invasive diagnosis after first-trimester assessment of risk for trisomy 21. *Am J Obstet Gynecol*. 2005a Aug; 193(2):322-6.
215. Nicolaidis KH, Spencer K, Avgidou K, Faiola S and 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(3):221-6.
216. Nicolaidis KH. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn* 2011; 31(1):7-15.
217. Nicolaidis KS, Azar G, Byrne D, Mansur C and Marks K. 1992. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ* 304: 867–869.
218. Nicolaidis, KH. *The 11-13+6 weeks Scan*. London: Fetal Medicine Foundation, London, 2004.
219. Nielsen J and Wohler M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet* 1991; 87(1):81-83.

220. Nishiyama M, Yan J, Yotsumoto J, Sawai H, Sekizawa A, Kamei Y and Sago H. Chromosome abnormalities diagnosed in utero: a Japanese study of 28 983 amniotic fluid specimens collected before 22 weeks gestations. *J Hum Genet* 2015; 60(3):133-37.
221. Novelli A, Sabani M, Caiola A, Digilio MC, Giannotti A, Mingarelli R, Novelli G and Dallapiccola B. Diagnosis of DiGeorge and Williams syndromes using FISH analysis of peripheral blood smears. *Mol Cell Probes* 1999; 13(4):303-07.
222. Nyberg DA, Souter VL, El-Bastawissi A, Young S, Luthhardt F and Luthy DA. Isolated sonographic markers for detection of fetal Down syndrome in the second trimester of pregnancy. *J Ultrasound Med* 2001; 20(10):1053-63.
223. Nyberg DA1, Luthy DA, Resta RG, Nyberg BC and Williams MA. Age-adjusted ultrasound risk assessment for fetal Down's syndrome during the second trimester: description of the method and analysis of 142 cases. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998; 12(1):8-14.
224. Ocak Z, Özlü T, Yazıcıoğlu HF, Özyurt O and Aygün M. Clinical and cytogenetic results of a large series of amniocentesis cases from Turkey: Report of 6124 cases. *J Obstet Gynaecol Res* 2014; 40(1):139-46.
225. Odibo AO, Gray DL, Dicke JM, Stamilio DM, Macones GA and Crane JP. Revisiting the fetal loss rate after second-trimester genetic amniocentesis: a single center's 16-year experience. *Obstet Gynecol* 2008; 111:589–95.
226. Ohye T, Inagaki H, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Macville MV, Medne L, Zackai EH, Emanuel BS and Kurahashi H. Paternal origin of the de novo constitutional t(11; 22)(q23;q11). *Eur J Hum Genet* 2010; 18: 783-787.
227. Paetzold U, Schwanitz G, Schubert R, van der Ven K and Montag M. Sperm analyses, genetic counselling and therapy in an infertile carrier of a supernumerary marker chromosome 15. *Adv Med Sci* 2006; 51:31-5.
228. Page SL and Shaffer LG. Nonhomologous Robertsonian translocations form predominantly during female meiosis. *Nat Genet* 1997; 15(3):231-2.
229. Page SL, Shin JC, Han JY, Choo KH and Shaffer LG. Breakpoint diversity illustrates distinct mechanisms for Robertsonian translocation formation. *Hum Mol Genet.* 1996; 5(9):1279-88.
230. Pardue ML and Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969; 64(2):600-04.
231. Park IY, Kwon JY, Kim YH, Kim M and Shin JC. Maternal ages specific rates of fetal chromosomal abnormalities at 16- 20 weeks' gestation in Korean pregnant women \geq 35 years of age. *Fetal Diagn Ther* 2010; 27:214-21.
232. Parra-Saavedra M, Cruz-Lemini M, Borobio V, Bennasar M, Goncé A, Martínez JM y Borrell A. Amniocentesis: guía práctica. *Diagn Prenat.* 2014; 25:20-27.
233. Patau K, Smith DW, Therman E, Inhorn SL and Wagner HP. Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. *Lancet* 1960;1 (7128):790-93.
234. Peng HH, Chao AS, Wang TH, Chang YL and Chang SD. Prenatally diagnosed balanced chromosome rearrangements: eight years' experience. *J Reprod Med* 2006 Sep; 51(9):699-703.

235. Penrose L.S. The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. *J Genet.* 2009; 88(1):9-14.
236. Perin L, Sedrakyan S, Da Sacco S and De Filippo R. Characterization of human amniotic fluid stem cells and their pluripotential capability. *Methods Cell Biol* 2008; 86:85-99.
237. Pertl B, Pieber D, Lercher-Hartlieb A, Orescovic I, Haeusler M, Winter R, Kroisel P and Adinolfi M. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy by quantitative fluorescent PCR on fetal samples from mothers at high risk for chromosome disorders. *Mol Hum Reprod* 1999; 5(12):1176-79.
238. Pertl B, Yau SC, Sherlock J, Davies AF, Mathew CG and Adinolfi M. Rapid molecular method for prenatal detection of Down's syndrome. *Lancet* 1994; 343(8907):1197-98.
239. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW and Albertson DG. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20(2):207-11.
240. Pinkel D, Straume T and Gray JV. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83: 2934-38.
241. Plachot M and Mandelbaum J. Oocyte maturation, fertilization and embryonic growth in vitro. *Br Med Bull* 1990; 46(3):675-94. Review.
242. Prusa AR and Hengstschlager M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. *Med Sci Monit.* 200; 8(11):RA253-7. Review.
243. Rai R and Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet.* 2006; 368(9535):601-11. Review.
244. Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH and Martin CL. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 2006; 43: 478-89.
245. Redon R, Baujat G, Sanlaville D, Le Merrer M, Vekemans M, Munnich A, Carter NP, Cormier-Daire V and Colleaux L. Interstitial 9q22.3 microdeletion: clinical and molecular characterisation of a newly recognised overgrowth syndrome. *Eur J Hum Genet* 2006; 14(6):759-67.
246. Rembouskos G, Passamonti U, De Robertis V, Tempesta A, Campobasso G, Volpe G, Gentile M and Volpe P. Aberrant right subclavian artery (ARSA) in unselected population at first and second trimester ultrasonography. *Prenat Diag* 2012; 32:968-75.
247. 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* 2005; 133A:31-36.
248. Riethman H, Ambrosini A and Paul S. Human subtelomere structure and variation. *Chromosome Res* 2005; 13(5):505-15.
249. Rizzu P and Baldini A. 1994. Subchromosomal band interval mapping and ordering of DNA markers in the region 3q26.3-q27 involved in the dup(3q) syndrome. *Genomics* 1994; 24(3):580-82.
250. Robberecht C, Voet T, Zamani Esteki M, Nowakowska BA and Vermeesch JR Nonallelic homologous recombination between retrotransposable elements is a driver of de novo unbalanced translocations. *Genome Res.* 2013; 23(3):411-18.

251. Roberts DJ and Genest D. Cardiac histologic pathology characteristic of trisomies 13 and 21. *Hum Pathol* 1992; 23(10):1130-40.
252. Robinson WP, Bernasconi F, Basaran S, Yüksel-Apak M, Neri G, Serville F, Balicek P, Haluza R, Farah LM and Lüleci G. A somatic origin of homologous Robertsonian translocations and isochromosomes. *Am J Hum Genet* 1994; 54(2):290-302.
253. Röthlisberger B and Kotzot D. Recurrence Risk in de novo Structural Chromosomal Rearrangements. *Am J Med Genet A* 2007; 143:1708-14.
254. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (RCOG). Chorionic villus sampling and amniocentesis. RCOG Press: London. <http://www.rcog.org.uk/womens-health/clinical-guidance/amniocentesischorionic-villus-sampling-cvs-what-you-need-know>. September 2011.
255. Scala C, Maggiore U, Candiani M, Venturini P, Ferrero S, Greco T and Cavoretto P. Aberrant right subclavian artery in fetuses with Down syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015; 46(3):266-76.
256. Schaffer LG and Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu Rev Genet* 2000; 34:297-329.
257. Schinzel A. Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man, De Gruyter, Berlin, NY, USA, 2nd edition, 2001.
258. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 1971; 30;2(7731):971-72.
259. Shao L, Shaw CA, Lu XY, Sahoo T, Bacino CA, Lalani SR, Stankiewicz P, Yatsenko SA, Li Y and Neill S. Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: a study of 5,380 cases. *Am J Med Genet A* 2008; 146A: 2242-51.
260. Sharma P, Gupta N, Chowdhury MR, Phadke SR, Sapra S, Halder A, Ghosh M and Kabra M. Williams-Beuren Syndrome: Experience of 43 Patients and a Report of an Atypical Case from a Tertiary Care Center in India. *Cytogenet Genome Res* 2015 Sep 10.
261. Sheth F, Ewers E, Kosyakova N, Weise A, Sheth J, Patil S, Ziegler M and Liehr T. A neocentric isochromosome Yp present as additional small supernumerary marker chromosome—evidence against U-type exchange mechanism? *Cytogenet Genome Res* 2009; 125:115-16.
262. Shipp TD, Bromley B, Mascola M and Benacerraf B. Variation in fetal femur length with respect to maternal race. *J Ultrasound Med* 2001; 20(2):141-4.
263. Sigurdardottir S, Goodman BK, Rutberg J, Thomas GH, Jabs EW and Geraghty MT. Clinical, cytogenetic, and fluorescence in situ hybridization findings in two cases of "complete ring" syndrome. *Am J Med Genet* 1999; 22; 87(5):384-90.
264. Simons A, Shaffer LG and Hastings RJ. Cytogenetic Nomenclature: Changes in the ISCN 2013 Compared to the 2009 Edition. *Cytogenet Genome Res* 2013; 141(1):1-6.
265. Smeets DF, Hamel BC, Nelen MR, Smeets HJ, Bollen JH, Smits AP, Ropers HH and van Oost BA. Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome in cousins from a family with a translocation between chromosomes 6 and 15. *N Engl J Med* 1992; 326(12):807-11.
266. Smidt-Jensen S and Hahnemann N. Transabdominal fine needle biopsy from chorionic villi in the first trimester. *Prenat Diagn* 1984; 4(3):163-69.

267. Snijders AM, Nowak N, Segraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, Hamilton G, Hindle AK, Huey B, Kimura K, Law S, Myambo K, Palmer J, Ylstra B, Yue JP, Gray JW, Jain AN, Pinkel D and Albertson DG. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 2001; 29(3):263-64.
268. Snijders RJ, Holzgreve W, Cuckle H and Nicolaides KH. Maternal age-specific risks for trisomies at 9-14 weeks' gestation. *Prenat Diagn.* 1994 Jul; 14(7):543-52.
269. Snijders RJ, Noble P, Sebire N, Souka A and Nicolaides KH. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. Fetal Medicine Foundation First Trimester Screening Group. *Lancet* 1998; 352(9125):343-46.
270. Snijders RJ, Sebire NJ and Nicolaides KH. Maternal age and gestational age-specific risk for chromosomal defects. *Fetal Diagn Ther* 1995; 10(6):356-67.
271. Snijders RJ, Sundberg K, Holzgreve W, Henry G and Nicolaides KH. Maternal age- and gestation-specific risk for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999; 13:167–170.
272. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO). Guía de práctica clínica: Diagnóstico prenatal de los defectos congénitos. Cribado de anomalías cromosómicas. *Diag Prenat* 2013; 24(2):57-72.
273. Sodré CP, Guilherme RS, Meloni VF, Brunoni D, Juliano Y, Andrade JA, Belangero SI, Christofolini DM, Kulikowski LD and Melaragno MI. Ring Chromosome instability evaluation in six patients with autosomal rings. *Genet Mol Res* 2010; 9 (1): 134-43.
274. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, D hner H, Cremer T and Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20(4):399-407.
275. Sonek J, Borenstein M, Dagklis T, Persico N and Nicolaides KH. Frontomaxillary facial angle in fetuses with trisomy 21 at 11-13(6) weeks. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196(3):271.e1-4.
276. Sonek J, Borenstein M, Downing C, McKenna D, Neiger R, Croom C, Genrich T and Nicolaides KH. Frontomaxillary facial angles in screening for trisomy 21 at 14-23 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 2007a; 197(2):160.e1-5.
277. Souka AP, Krampfl E, Bakalis S, Heath V and Nicolaides KH. Outcome of pregnancy in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency in the first trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; 18(1):9-17. Review.
278. Souka AP, Snijders RJ, Novakov A, Soares W and 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(6):391-400.
279. Souka AP, Von Kaisenberg CS, Hyett JA, Sonek JD and Nicolaides KH. Increased nuchal translucency with normal karyotype. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192(4):1005-21.
280. Spencer K, Macri JN, Aitken DA and Connor JM. Free beta-hCG as first-trimester marker for fetal trisomy. *Lancet* 1992; 339(8807):1480.

281. Spencer K, Spencer CE, Power M, Moakes A and Nicolaidis KH. One stop clinic for assessment of risk for fetal anomalies: a report of the first year of prospective screening for chromosomal anomalies in the first trimester. *Br J Obstet Gynaecol* 2000; 107:1271-75.
282. Spencer K. Second trimester prenatal screening for Down's syndrome using alpha-fetoprotein and free beta hCG: a seven year review. *Br J Obstet Gynaecol* 1999; 106(12):1287-93.
283. Stankiewicz P and Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphism, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17(3):182-92
284. Stankiewicz P, Lupski JR: Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 2002; 18: 74– 82.
285. Steele MW and Breg WY. Chromosome analysis of human amniotic fluid. *Lancet* 1966; 19(383-385).
286. Sugiura-Ogasawara M, Aoki K, Fujii T, Fujita T, Kawaguchi R, Maruyama T, Ozawa N, Sugi T, Takeshita T, Saito S. Subsequent pregnancy outcomes in recurrent miscarriage patients with a paternal or maternal carrier of a structural chromosome rearrangement. *J Hum Genet* 2008; 53(7):622-28.
287. Tabor A, Vestergaard CHF and Lidgaard O. Fetal loss rate after chorionic villus sampling and amniocentesis: an 11-year national registry study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009; 34:19–24.
288. Tan M, Xu C, Sim SK, Seow AL, Tan TH and Quek SC. Types and distribution of congenital heart defects associated with trisomy 21 in Singapore. *J Paediatr Child Health* 2013; 49(3):223-27.
289. Therman E, Susman B and Denniston C. The nonrandom participation of human acrocentric chromosomes in Robertsonian translocations. *Ann Hum Genet* 1989; 53(Pt 1):49-65. Review.
290. Thomas NS, Bryant V, Maloney V, Cockwell AE, and Jacobs PA. Investigation of the origins of human autosomal inversions. *Hum Genet* 2008; 123(6):607-16.
291. Thomas NS, Durkie M, Potts G, Sandford R, Van Zyl B, Youngs S, Dennis NR and Jacobs PA. Parental and chromosomal origins of microdeletion and duplication syndromes involving 7q11.23, 15q11–q13 and 22q11. *Eur J Hum Genet* 2006; 14:831-37.
292. Thomas NS, Morris JK, Baptista J, Ng BL, Crolla JA and Jacobs PA. De novo apparently balanced translocations in man are predominantly paternal in origin and associated with a significant increase in paternal age. *J Med Genet* 2010; 47(2):112-5.
293. Thompson & Thompson, 7a ed.: *Genética en medicina*. Elsevier Masson. Elsevier España 2008.
294. Tislarić-Medenjak D, Zec I, Simundić AM, Sabolović-Rudman S, Kos M and Megla ZB. The impact of temporal variability of biochemical markers PAPP-A and free beta-hCG on the specificity of the first-trimester Down syndrome screening: a Croatian retrospective study. *BMC Res Notes* 2010; 3:194.
295. Tjio JH y Levan A. The chromosome number in man. *Hereditas*, vol. 42, pp. 1-6, 1956.
296. Tongsong T, Wanapirak C, Piyamongkol W, Sirirchotiyakul S, Tongprasert F, Srisupundit K, Luewan S and Trisrisilp K. Second-trimester cordocentesis and the risk of small for gestational age and preterm birth. *Obstet Gynecol* 2014; 124(5):919-25.

297. Tseng JJ, Chou MM, Lo FC, Lai HY, Chen MH and Ho ES. Detection of chromosome aberrations in the second trimester using genetic amniocentesis: Experience during 1995–2004. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2006; 45(1):39-41.
298. Tul N, Spencer K, Noble P, Chan C and Nicolaidis K. Screening for trisomy 18 by fetal nuchal translucency and maternal serum free beta-hCG and PAPP-A at 10-14 weeks of gestation. *Prenat Diagn* 1999; 9(11):1035-42.
299. Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA, Kaul R, Morrison VA, Pertz LM, Haugen E, Hayden H, Albertson D, Pinkel D, Olson MV and Eichler EE. Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat Genet.* 2005; 37(7):727-32.
300. Utami KH, Hillmer AM, Aksoy I, Chew EG, Teo AS, Zhang Z, Lee CW, Chen PJ, Seng CC, Ariyaratne PN, Rouam SL, Soo LS, Yousoof S, Prokudin I, Peters G, Collins F, Wilson M, Kakakios A, Haddad G, Menuet A, Perche O, Tay SK, Sung KW, Ruan X, Ruan Y, Liu ET, Briault S, Jamieson RV, Davila S and Cacheux V. Detection of chromosomal breakpoints in patients with developmental delay and speech disorders. *PLoS One* 2014; 6; 9(6):e90852.
301. Valduga M, Philippe C, Bach Segura P, Thiebaugeorges O, Miton A, Beri M, Bonnet C, Nemos C, Foliguet B and Jonveaux P. A retrospective study by oligonucleotide array-CGH analysis in 50 fetuses with multiple malformations. *Prenat Diagn* 2010; 30(4):333-41.
302. Vanneste E, Voet T, Melotte C, Debrock S, Sermon K, Staessen C, Liebaers I, Fryns JP, D'Hooghe T and Vermeesch JR. What next for preimplantation genetic screening? High mitotic chromosome instability rate provides the biological basis for the low success rate. *Hum Reprod* 2009; 24(11):2679-82.
303. Veltman JA, Fridlyand J, Pejavar S, Olshen AB, Korkola JE, DeVries S, Carroll P, Kuo WL, Pinkel D, Albertson D, Cordon-Cardo C, Jain AN and Waldman FM. Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors. *Cancer Res* 2003; 63(11):2872-80.
304. Vermeesch JR, Baten E, Fryns J-P, Devriendt K. Ring syndrome caused by ring chromosome7 without loss of subtelomeric sequences. *Clin Genet* 2002; 62:415-417.
305. Vermeesch JR, Melotte C, Salden I, Riegel M, Trifnov V, Polityko A, Rumyantseva N, Naumchik I, Starke H, Matthijs G, Schinzel A, Fryns JP and Liehr T. Tetrasomy 12pter-12p13.31 in a girl with partial Pallister-Killian syndrome phenotype. *Eur J Med Genet* 2005; 48(3):319-27.
306. Visser R, Shimokawa O, Harada N, Kinoshita A, Ohta T, Niikawa N and Matsumoto N. Identification of a 3.0-kb major recombination hotspot in patients with Sotos syndrome who carry a common 1.9-Mb microdeletion. *Am J Hum Genet.* 2005; 76(1):52-67.
307. Viuff MH, Stochholm K, Ulbjerg N, Nielsen BB; Danish Fetal Medicine Study Group, Gravholt CH. Only a minority of sex chromosome abnormalities are detected by a national prenatal screening program for Down syndrome. *Hum Reprod* 2015; 30(10):2419-26.
308. Vlatkovic V, T Hafner T, Miskovic B, Vivic A, Poljak B and Stipoljev F. Prenatal diagnosis of sex chromosome aneuploidies and disorders of sex development – a retrospective analysis of 11-year data. *J Perinat Med* 2014; 42(4): 529-534.

309. Voglino G, Marongiu A, Massobrio M, Campogrande M and Todros T. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies. *Lancet* 2002; 2; 359(9304):442.
310. von Sneidern E and Lacassie Y. Is trisomy 14 mosaic a clinically recognizable syndrome?--case report and review. *Am J Med Genet A* 2008; 15; 146A(12):1609-13.
311. Vozdova M, Heracek J, Sobotka V and Rubes J. Testicular sperm aneuploidy in non-obstructive azoospermic patients. *Hum Reprod* 2012; 27(7):2233-39.
312. Vozdova M, Oracova E, Musilova P, Kasikova K, Prinosilova P, Gaillyova R and Rubes J. Sperm and embryo analysis of similar t(7;10) translocations transmitted in two families. *Fertil Steril* 2011; 96: e66-70.
313. Wagstaff J and Hemann M. A familial "balanced" 3;9 translocation with cryptic 8q insertion leading to deletion and duplication of 9p23 loci in siblings. *Am J Hum Genet* 1995; 56:302-309.
314. Wald NJ, George L, Smith D, Densem JW and Petterson K. Serum screening for Down's syndrome between 8 and 14 weeks of pregnancy. International Prenatal Screening Research Group. *BJOG* 1996; 103(5):407-12.
315. Wald NJ, Huttly WJ and Hackshaw AK. Antenatal screening for Down's syndrome with the quadruple test. *Lancet* 2003; 361(9360):835-6.
316. Wapner RJ. Invasive prenatal diagnostic techniques. *Semin Perinatol*; 29(6):401-4. Review.
317. Warburton D and Miller R. Present status and future trends in prenatal diagnosis of chromosomal disorders. *Clin Obstet Gynecol.* 1972 Mar;15(1):272-82. Review.
318. Warburton D, Dallaire L, Thangavelu M, Ross L, Levin B and Kline J. Trisomy recurrence: A reconsideration based on North American data. *Am J Hum Genet* 2004; 75:376-385.
319. Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet* 1991; 49:995-1013.
320. Weise A, Mrasek K, Klein E, Mulatinho M, Llerena JC Jr, Hardekopf D, Pekova S, Bhatt S, Kosyakova N and Liehr T. Microdeletion and microduplication syndromes. *J Histochem Cytochem.*2012; 60(5):346-58.
321. Welch RA, Salem-Elgharib S, Wiktor AE, Van Dyke DL and Blessed WB. Operator experience and sample quality in genetic amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194:189-191.
322. Wellesley D, Dolk H, Boyd PA, Greenlees R, Haeusler M, Nelen V, Garne E, Khoshnood B, Doray B, Rissmann A, Mullaney C, Calzolari E, Bakker M, Salvador J, Addor MC, Draper E, Rankin J and Tucker D. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *Eur J Hum Genet* 2012; 20(5):521-26.
323. Wolman I, Jaffa A, Geva E, Diamant S, Strauss S, Lessing JB and Yaron Y. Intracardiac echogenic focus: no apparent association with structural cardiac abnormality. *Fetal Diagn Ther* 2000; 15(4):216-8.
324. Wren C, Richmond S and Donaldson L. Temporal variability in birth prevalence of cardiovascular malformations. *Heart* 2000; 83, 414-19.

325. Wright D, Spencer K, Kagan K K, Tørring N, Petersen OB, Christou A, Kallikas J and Nicolaides KH. First-trimester combined screening for trisomy 21 at 7-14 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010; 36(4):404-11.
326. Wu Q, Wang W, Kong H, Sun L, Ge Y, Xu Y, and Zhou Y. Investigation of the frequencies of prenatally diagnosed fetal chromosomal abnormalities at a single institution. *Fetal Pediatr Pathol* 2013; 32(3):163-68.
327. Wyandt H and Tonk VS. *Human chromosome variation: Heteromorfism and polymorphism*: Springer Dordrecht Heidelberg London New York 2011.
328. Yagel S and Valsky DV. From anatomy to function: the developing image of ultrasound evaluation. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008; 31(6):615-7.
329. Yakut S, Clarck OA, Sanhal C, Nur BG, Mendilcioglu I, Karauzum SB and Cetin Z. A familial interstitial 4q35 deletion with no discernible clinical effects. *Am J Med Genet A* 2015; 167A(8):1836-41.
330. Zahed L, Murer-Orlando M and Vekemans M. In situ hybridization studies for the detection of common aneuploidies in CVS. *Prenat Diagn* 1992; 12(6):483-93.
331. Zalel Y, Achiron R, Yagel S, Kivilevitch Z. Fetal aberrant right subclavian artery in normal and Down syndrome fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 31(1):25-29.
332. Zeitlin J, Mohangoo A, Cuttini M; EUROPERISTAT Report Writing Committee, Alexander S, Barros H, Blondel B, Bouvier-Colle MH, Buitendijk S, Cans C, Correia S, Gissler M, Macfarlane A, Novak-Antolic Z, Zeitlin J, Zhang WH, Zimbeck M. The European Perinatal Health Report: comparing the health and care of pregnant women and newborn babies in Europe. *J Epidemiol Community Health* 2009; 63(9):681-82.
333. Zhang YP, Wu JP, Li XT, Lei CX, Xu JZ and Yin M. Karyotype analysis of amniotic fluid cells and comparison of chromosomal abnormality rate during second trimester. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2011; 46(9):644-48.
334. Zolese G and Blacker CV. The psychological complications of therapeutic abortion. *Br J Psychiatry* 1992; 160:742-49. Review.