



GESTACIÓN PRECOZ Y GESTACIÓN DE LOCALIZACIÓN DESCONOCIDA

Marian Fernández Cruz

23/02/2023

INTRODUCCIÓN

La evolución de la calidad en las imágenes gracias al uso de la ecografía transvaginal y la mejora en el rendimiento de los equipos de ultrasonido han hecho que en la actualidad dispongamos de imágenes ecográficas de gran calidad que nos permiten identificar y comprender las diferentes fases del desarrollo embrionario, su cinética de crecimiento, así como las desviaciones del mismo, que motiven una pérdida gestacional temprana.

Desde el punto de vista del diagnóstico de una pérdida gestacional temprana es importante basarse en criterios ecográficos seguros, que nos ofrezcan la suficiente certeza como para no interrumpir gestaciones potencialmente viables.

De la misma forma, el diagnóstico ecográfico, así como el manejo de la gestación de localización desconocida, supone un importante reto en el que debemos contemplar tanto la seguridad en el diagnóstico como la precocidad del mismo, con el fin de minimizar los riesgos sobre una posible rotura de una gestación ectópica no visualizada [1].

ECOGRAFÍA EN LA GESTACIÓN TEMPRANA

La edad embriológica se basa en el tiempo desde la concepción, esto es 14 días menos que la edad gestacional o edad menstrual, en una paciente con un ciclo de 28 días.

El periodo embrionario de organogénesis comprende las primeras 10+6 semanas gestacionales posmenstruales.

La exploración ecográfica puede ser útil para el diagnóstico y manejo adecuado de la gestación precoz. Sin embargo, no se realiza de forma rutinaria simplemente para confirmar una gestación en curso, sino que se realizará en

caso de presentar otros síntomas como dolor o sangrado por los que la paciente acude a urgencias.

Es recomendable considerarla en casos seleccionados como gestación ectópica previa, antecedente de patología tubárica, técnica de reproducción asistida, aborto de repetición, cirugía previa o cesárea anterior.

OBJETIVOS ECOGRAFÍA DURANTE PERÍODO EMBRIONARIO

Los objetivos de la ecografía en la gestación temprana son los siguientes:

- Confirmar la viabilidad embrionaria
- Establecer con precisión la edad gestacional
- Diagnosticar la localización de la gestación
- Realizar un diagnóstico temprano de gestación extrauterina
- Determinar el número de embriones
- Evaluar la corionicidad y la amnionicidad en presencia de gestación múltiple
- Diagnosticar patología útero-anexial asociada
- Detectar precozmente complicaciones gestacionales
- Diagnosticar patología malformativa embrionaria

HALLAZGOS ECOGRÁFICOS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Para interpretar correctamente los hallazgos ecográficos de una gestación precoz es necesario comprender la embriología y estar familiarizado con los principales hitos del desarrollo embrionario durante cada semana de gestación, que serán fácilmente identificables mediante ecografía, ya que la presencia o ausencia de ciertas estructuras pueden considerarse normal o anormal dependiendo de la edad gestacional.

La edad gestacional mediante ecografía se basa en la aparición del saco gestacional, el tamaño del embrión (medida del CRL), y posteriormente la medida de partes fetales (cráneo, huesos largos, abdomen...)

En los estadios más precoces de la gestación la ecografía transvaginal suele proporcionar imágenes más claras y precisas que la ecografía abdominal, por ello es la técnica recomendada para la evaluación del saco gestacional y otras estructuras embrionarias (vesícula vitelina, identificación precoz de la actividad cardíaca).

A pesar de que el saco gestacional es el parámetro que más precozmente podemos medir para determinar la edad gestacional, el CRL es el indicador más preciso, por tanto, cuando el polo embrionario sea visible debemos utilizar el CRL para determinar la fecha probable de parto, ya que proporciona una estimación más precisa y una menor variabilidad que la medida del saco gestacional [1].

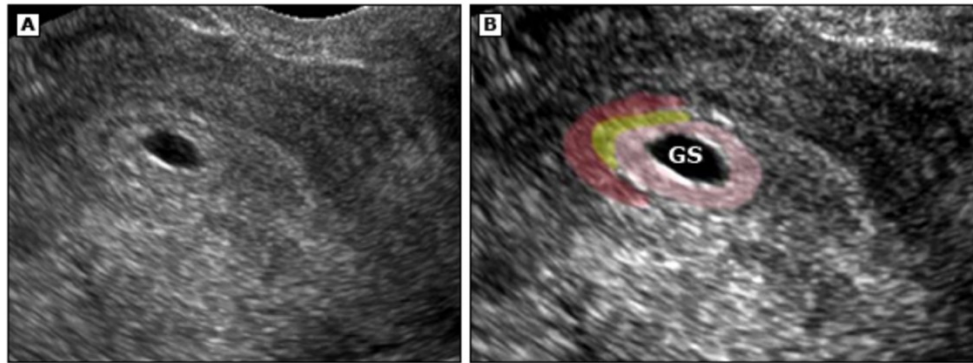
1. Saco gestacional

El saco gestacional es la manifestación ecográfica más precoz del desarrollo embrionario.

Se visualiza desde la semana 4-4+6 posmenstruales, como una pequeña colección de líquido a nivel intrauterino, econegativo, redondeado, de unos 2-3 mm de diámetro, con un reborde ecogénico alrededor.

Para confirmar que corresponde realmente a un saco gestacional antes de visualizar la vesícula vitelina en su interior se han descrito dos signos ecográficos:

- **Signo intradecidual:** es el más precoz. Se trata de una colección líquida rodeada de un anillo ecogénico en una de las hojas endometriales, con desviación del eco endometrial central.
- **Signo del “doble anillo”:** la decidua capsular y parietal forman dos anillos hiperecogénicos separados por una pequeña colección líquida hipoeicoica.



*Imagen 1. Imagen A: signo intradecidual. Imagen B: signo del doble anillo.
Imagen de MacKenzie A. Et al. Prenatal assesment of gestational age, date of delivery,
and fetal weight. Uptodate. 2022*

Por tanto, estos dos signos se utilizan para determinar si se trata de un embarazo intrauterino. Sin embargo, estos signos no son constantes y su ausencia no necesariamente debe relacionarse con una mala evolución de la gestación [1,2].

Para medir de forma correcta el saco gestacional se debe colocar el calíper de borde interno a borde interno, sin incluir la región ecogénica que rodea el saco gestacional. El diámetro será el promedio del diámetro transverso, sagital y anteroposterior [3].

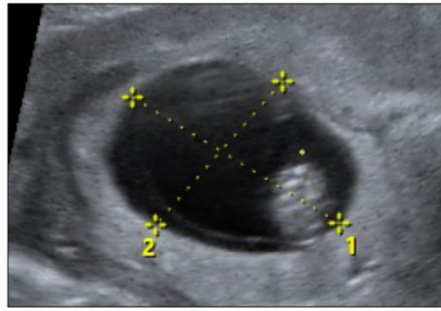


Imagen 2. Medición del saco gestacional. Procedente del texto MacKenzie A. Et al. Prenatal assesment of gestational age, date of delivery, and fetal weight. Uptodate. 2022

Crece a un ritmo de 1 mm diario (siempre por encima de 0,6 mm). Existen normogramas del DMVG (diámetro de vesícula gestacional) que se han empleado para determinar la edad gestacional en las primeras semanas de gestación, aunque esto tiene un valor limitado dada la amplia variabilidad que puede presentar.

La medida del saco gestacional es menos precisa cuando mide más de 14 mm, y cuando se puede identificar el polo embrionario, por tanto, se utiliza únicamente para datar gestaciones muy precoces, antes de poder medir el CRL. No debe utilizarse por encima de las 7 semanas.

Un saco gestacional de 2-3 mm es el menor diámetro que puede ser claramente visualizado en la cavidad uterina, y que correspondería aproximadamente a una edad gestacional de 4 semanas y 3 días.

2. Vesícula vitelina secundaria

Se trata de la primera estructura que aparece en el interior del saco gestacional.

Será visible a partir de la quinta semana de gestación, o 3 semanas de vida embrionaria, por lo que su presencia confirma la existencia de una gestación intrauterina con un VPP del 100%.

Se trata de la primera fuente de células sanguíneas y células madre del embrión.

Se visualiza como un pequeño anillo hiperecogénico con centro anecoico, de contorno liso y fino, de localización excéntrica.

La medida suele realizarse desde la parte interna del mismo, hasta la parte interna de la cara opuesta [1].

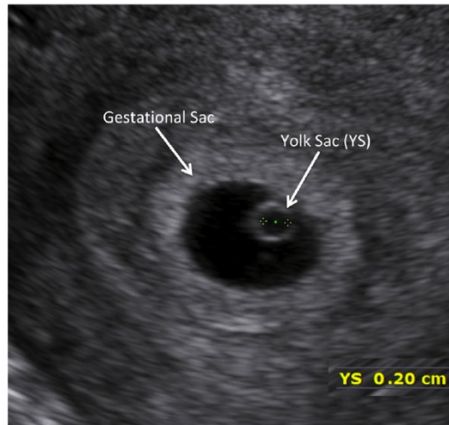


Imagen 3. Vesícula vitelina (yolk sac) en interior de saco gestacional. Imagen de Detti L. Et al. *Early pregnancy ultrasound measurements and prediction of first trimester pregnancy loss: a logistic model. Nature. 2021*

Si la vesícula no es completamente esférica, se toman las 3 medidas y se obtiene la media.

Puede visualizarse por tanto a partir de las 5-6 SG, cuando el diámetro del saco gestacional es de 5-6mm (siempre se visualiza con diámetro medio de la vesícula gestacional ≥ 10 mm, aumentando su tamaño de forma lineal (0,4mm/semana) hasta las 10 SG, momento en el que puede alcanzar los 6 mm para posteriormente disminuir su tamaño.

No se suele visualizar a las 12-13 SG.

El diámetro de la vesícula vitelina se correlaciona pobremente con la edad gestacional, por lo que no se utiliza para ello. Sin embargo, sí que se ha estudiado que una vesícula mayor de 6 mm se asocia con pérdida gestacional precoz.

El estudio *Pilot*, desarrollado por *Laura Detti et al. [4]*, se trata de un estudio prospectivo de cohortes en el que se estudió el diámetro de vesículas vitelinas de 193 pacientes embarazadas, en las que se realizaron ecografías seriadas desde la semana 5 hasta la 11. Este estudio demostró el crecimiento de la vesícula vitelina de 0,4 mm (95% IC; 0,3-0,5mm) por semana hasta la semana 10. El riesgo de pérdida precoz del embarazo fue mayor cuando el tamaño de la vesícula vitelina se encontraba por encima de la media antes de las 8 semanas ($P \leq 0.001$), mientras que tras las 8 semanas, el riesgo era mayor cuando el tamaño de la vesícula se encontraba por debajo de la media ($P < 0.005$) [4].

Aunque la etiología de un diámetro de la vesícula es desconocido, aproximadamente entre el 18,2-66,2% de las vesículas vitelinas con un diámetro por encima de los 5-6mm se han asociado con cariotipos anormales [5,6].

El hecho de que una vesícula vitelina de pequeño tamaño se asociaría, más que con anomalías genéticas, con una pérdida de embarazo mas tardía podría explicarse por alteraciones placentarias, como por ejemplo la insuficiencia placentaria.

El estudio de *Laura Detti et al.* [4] establece un patrón de crecimiento de la vesícula vitelina durante el primer trimestre, y además establece este parámetro como un indicador pronóstico fiable de pérdida precoz de la gestación. Estos hallazgos pueden ser clínicamente útiles para determinar que pacientes precisan un seguimiento más estrecho.

3. Amnios

Es una membrana fina que rodea al embrión. Normalmente se visualiza después de la aparición de la vesícula vitelina y casi paralela con el embrión. El amnios presenta un tamaño similar al embrión hasta la semana 10, en la que la cavidad amniótica crece rápidamente y llena la cavidad coriónica con la eventual fusión del amnios y corion en las semanas 14-16.

En una gestación normal, el amnios debería contener un embrión vivo de 7-12mm de longitud, por lo que la ausencia de embrión en presencia de saco amniótico es un factor predictor de aborto.

En el estudio de *Dooley W et al.* [7] se estudió el valor predictivo de la presencia de saco amniótico en ausencia de latido cardíaco embrionario como diagnóstico de pérdida precoz. Este estudio incluyó 6012 embarazadas que acudieron al servicio de urgencias con síntomas sugestivos de complicaciones del embarazo precoz.

Se encontró un saco amniótico con ausencia de embrión en su interior en un 15,3% (174/1135 pacientes con viabilidad incierta). De estas 174 pacientes, se confirmó la pérdida gestacional en las 134 que completaron el seguimiento, por lo que se confirmó una especificidad del 100% (95% IC 98,53-100%), con un VPP del 100% (95% IC 97,2-100%) para el diagnóstico de pérdida gestacional precoz.



Imagen 4. Saco amniótico con ausencia de embrión en su interior. Imagen procedente del estudio Dooley W. Et al. Predictive value of presence of amniotic sac without visible embryonic heartbeat in diagnosis of early embryonic demise. Ultrasound Obstet Gynecol 2021.

Se trata por tanto de un marcador fiable y que podría reducir el número de seguimientos hasta en un 11% en los casos de gestación incierta.

Estos resultados fueron concordantes con los resultados publicados por *Mac Kenna et al.* 2009 y *Yegul y Filly* 2009.

4. Cavity coriónica.

La cavidad coriónica se caracteriza por presentar un contenido rico en proteínas y más viscoso que el líquido amniótico. Podría tener un papel nutritivo para el embrión hasta que se establece su circulación definitiva. Ecográficamente aparece menos sonoluscente que el amnios, con finos ecos en su interior [1].

5. Cordón umbilical

Se desarrolla a partir del pedículo de fijación. Está compuesto por dos arterias, una vena, la alantoides y el conducto vitelino (onfalo-mesentérico). A partir de la semana 7 es posible identificar su inserción en la placenta, la incorporación del conducto vitelino y su entrada en la pared abdominal [1].

6. Placenta

El corion frondoso se visualiza a partir de las 7-8 SG como un engrosamiento focal en la zona de unión entre el saco gestacional y la cavidad endometrial, mientras que el corion liso se visualiza como una membrana lisa. La unión del corion frondoso y la decidua basal formarán la placenta [1].



Imagen 5. Saco gestacional con vesícula vitelina y embrión en su interior. Imagen procedente de Águeda J et al. Gestación precoz. Pérdida gestacional temprana. Gestación de localización no conocida. Guía de asistencia práctica de la sección de ecografía obstétrico-ginecológica de la SEGO publicada en junio de 2021.

7. Embrión

El embrión se visualiza por primera vez a partir de la 5ª semana de gestación como una estructura de unos 1-2mm, en íntimo contacto con la vesícula vitelina. La actividad cardíaca puede detectarse cuando el embrión alcanza los 2mm (con una edad gestacional de 5,5 a 6 semanas de gestación) [8]. La frecuencia cardíaca va incrementándose desde 100-115latidos/min a las 5-6

semanas de gestación a 170-180 latidos/min a las 9-10 semanas gestacionales, para luego ir reduciéndose paulatinamente.

El embrión crece a un ritmo de 1 mm al día. Su medición se realiza mediante CRL, que es el parámetro embrionario más preciso para estimar la edad gestacional con un margen de error de unos 5-7 días.

El ritmo de crecimiento del embrión durante las primeras etapas del desarrollo, tanto en gestaciones tras técnica de reproducción asistida como espontáneas, puede presentar variaciones y estar influenciado por factores tanto intrínsecos como extrínsecos al propio embrión.

Para realizar de forma correcta la medición del embrión se debe tomar una imagen sagital, idealmente con el embrión de forma horizontal, y se ampliará la imagen para que ocupe la totalidad de la pantalla.

A finales de la 6ª semana y al inicio de la 7ª deberán objetivarse el polo cefálico y el caudal, donde colocaremos los cálipers [1,8].

GESTACIÓN DE LOCALIZACIÓN DESCONOCIDA (GLD)

El embarazo ectópico se define como un embarazo que ocurre fuera del útero. La localización más frecuente es la trompa, aunque también pueden ocurrir en el ovario, cavidad abdominal o cuerno uterino.

La prevalencia de embarazo ectópico es del 2% del total de embarazos, y es responsable de hasta el 6% de las muertes relacionadas con el embarazo.

Los síntomas típicos son la amenorrea, dolor abdominal o sangrado vaginal, y en casos graves síncope e incluso shock.

Por todo ello, el diagnóstico y tratamiento precoz son especialmente importantes.

En la actualidad, el diagnóstico de embarazo ectópico depende principalmente de la ecografía transvaginal y la medida cuantitativa de la BhCG.

En caso de visualizar la gestación se realizaría el diagnóstico de forma directa, sin embargo la ecografía puede ser no concluyente en el diagnóstico de gestación incipiente (es decir, no se objetiva embarazo en el útero ni anejos) hasta en un 40% de las mujeres con síntomas [1,9].

En aquellas situaciones en las que coexiste un resultado de BhCG en orina o sangre positivo, sin objetivar la gestación de forma ecográfica intra o extrauterina hablamos de gestación de localización desconocida o GLD.

La incidencia de GLD es aproximadamente un 8-10%, y dependerá fundamentalmente de la calidad del ecógrafo y del examen realizado. [10]

No se trata de un diagnóstico en sí, sino de una situación transitoria, que debemos manejar hasta llegar al diagnóstico final:

- **Gestación intrauterina viable o no viable.**
- **Gestación bioquímica resuelta** (niveles de BhCG en descenso hasta negativizarse sin llegar a visualizar saco gestacional intra o extrauterino).
- **Gestación extrauterina.**
- **GLD persistente** (gestación localización desconocida persistente). En esta situación los niveles de BhCG permanecerían en meseta (aumento

o disminución <15% en 3 muestras consecutivas en 48 horas), pudiendo descender de forma espontánea, o bien tras evacuación uterina o tratamiento con metotrexate.

La importancia de esta situación es que en aproximadamente un 10% de estas gestaciones será de localización extrauterina, con las consecuencias derivadas de este diagnóstico, cifra que podría elevarse en el caso de las técnicas de reproducción asistida, aunque la literatura existente sobre este tema es escasa.

Es importante un diagnóstico definitivo y precoz, tanto para evitar las complicaciones asociadas, como para evitar tratar con metotrexate una gestación intrauterina potencialmente viable.

Existen múltiples esquemas de manejo en estas pacientes, sin embargo, no existe en el momento actual ningún consenso ni guía aceptada de forma universal [1,10].

Diagnóstico:

El diagnóstico se realizará mediante la combinación de imágenes ecográficas junto a la determinación de marcadores séricos.

El diagnóstico de una mujer que se presenta inicialmente como una gestación de localización incierta requiere múltiples visitas para análisis de sangre, ecografías e incluso procedimientos quirúrgicos antes de llegar al diagnóstico definitivo.

Durante este tiempo hasta el diagnóstico definitivo un embarazo ectópico podría llegar a romperse, llevando a una futura infertilidad y una hemorragia intraabdominal que podría poner en peligro la vida de la paciente.

Por ello es esencial un diagnóstico precoz, tanto para evitar la posible morbilidad derivada de un embarazo ectópico, como para diferenciar una gestación intrauterina anormal, que tendría un tratamiento diferente, o incluso una gestación intrauterina normoevolutiva.

Por este motivo se han estudiado numerosos biomarcadores, que podrían ayudar a determinar la localización y la viabilidad de la gestación.

Los biomarcadores pueden clasificarse en subgrupos según reflejen la función del trofoblasto, cuerpo lúteo, endometrio y angiogénesis. La mayoría de biomarcadores se encuentran en fases iniciales de estudio, y no han sido testados en ensayos clínicos.

En el momento actual los únicos biomarcadores válidos con aplicación en la práctica clínica son los niveles séricos de BhCG y progesterona.

1. **Ecografía:** debe realizarse una revisión de forma detallada por vía transvaginal, incorporando la vía transabdominal en caso de que ésta no sea concluyente.

Es importante revisar ambos trayectos tubáricos en búsqueda de signos ecográficos de gestación ectópica, y en caso de no hallarlos, tratar de identificar la normalidad ecográfica tubárica en su totalidad, aunque esto puede no ser posible en todas las pacientes.

La presencia de líquido periovárico puede facilitar la visión de la porción ampular.

Será importante describir detalladamente la exploración con el fin de valorar posibles cambios al realizar las ecografías seriadas, que puedan orientar a gestación intra o extrauterina.

Cuando se realizan ecografías seriadas la sensibilidad y especificidad son del 87-94% y 94-99% respectivamente.

Es importante mencionar que la sensibilidad de la ecografía puede verse afectada por varios factores, como la calidad del equipo, la experiencia del ecografista, o la presencia de miomas [1].

2. **Marcadores séricos:** los principales serán:

- **BhCG:** es el marcador más utilizado. Refleja la actividad del trofoblasto. La medida de una única determinación del nivel de hCG no suele ser útil para predecir el resultado de una gestación de localización incierta. Se suele realizar la determinación de BhCG sérica, seriada (cociente BhCG sérica basal y a las 48 horas), o bien a través de modelos predictivos.

- o **Nivel discriminatorio de BhCG sérica:** es el nivel umbral mínimo en el que debemos identificar el saco gestacional. En caso de no visualizarse, el riesgo de gestación ectópica aumenta. La mayoría de autores describen estos niveles entre 1500-2000 mUI/ml. Sin embargo existen publicaciones con actividad cardíaca presente en casos con niveles iniciales >2000mUI/ml y no visualización de saco gestacional, e incluso de hasta 3500 mUI/ml y mayores [10].

Además, el incremento de la hCG en 48 horas en caso de una gestación evolutiva difiere según la concentración inicial de esta hormona. Cuando se encuentra por debajo de 1500mUI/ml aumenta aproximadamente un 49%, cuando se encuentra entre 1500-3000mUI/mL suele aumentar en torno al 40%, y un 33% cuando el valor inicial es mayor de 3000mUI/ml [11].

Por ello, una gestación intrauterina viable puede aumentar la hCG más lentamente de lo que inicialmente podría pensarse.

Por tanto es complicado establecer una recomendación sobre el punto de corte por encima del cual debemos tratar a la paciente por sospecha de GE ante la no visualización del saco gestacional intrauterino.

Es importante no basar la decisión en una única determinación de BhCG, sino seriar las determinaciones analíticas y realizar ecografías seriadas en caso de pacientes hemodinámicamente estables.

- o **Cociente BhCG sérica y basal a las 48 horas:**
 - <0,87 indicaría probable aborto bioquímico.
 - Mayor o igual a 0,87 y menor o igual a 1,66 indicaría probable gestación ectópica o gestación ectópica persistente.
 - >1,66 indicaría probable gestación intrauterina evolutiva.
- La sensibilidad del ratio de hCG (hCG a las 48 horas/hCG a las 0 horas) para predecir un embarazo ectópico varía

desde el 74-100%, mientras que la especificidad puede variar del 28-97% [12].

- **Progesterona:** la progesterona sérica es un progestágeno natural producida por el cuerpo lúteo, placenta y glándulas adrenales, cuya función principal es mantener la gestación. Un metaanálisis demostró que los niveles séricos de progesterona son un marcador útil de viabilidad, pero serían incapaces de predecir la localización de la gestación. [1,12]

Un estudio prospectivo realizado en 252 pacientes con gestación de localización incierta y demostró una asociación entre una Progesterona ≤ 10 nmol/L se han asociado con fracasos en la GLD del 98% (95% IC; 96,8%-99,7%), y que esto podría utilizarse como criterio para seleccionar a las pacientes que no precisan un seguimiento tan estrecho. [13]

Según la guía de la SEGO [1] se consideraría un valor < 5 nmol/l como indicativo de no viabilidad, mientras que valores > 20 serían indicativos de viabilidad. Sin embargo no se relaciona con la localización intra o extrauterina.

Por tanto, la progesterona ayudaría a clasificar a la paciente como bajo riesgo de gestación ectópica, pudiendo utilizar un esquema de manejo menos intensivo. Es importante en caso de uso de suplementos de progesterona tener en cuenta que podría alterar los resultados.

- **Modelos matemáticos de predicción.** Estos modelos se desarrollan como herramientas de ayuda para determinar tanto la localización como los posibles riesgos y complicaciones de mujeres clasificadas como GLD.

- o El **modelo M4** es un modelo de regresión logística basada en la determinación inicial sérica de hCG y el ratio de hCG como variables. Este modelo clasifica las gestaciones de localización desconocida como bajo riesgo de embarazo ectópico si es $< 5\%$, y alto riesgo si es ≥ 5 .

El seguimiento se realizaría en los casos de bajo riesgo de gestación ectópica, con determinación de hCG en orina en 2 semanas, o bien, ecografía transvaginal en una semana. Para los casos de alto riesgo de gestación ectópica se realizaría la determinación sérica de hCG y ecografía transvaginal cada 48 horas.

En una población de 1962 pacientes, este modelo fue capaz de clasificar al 69,6% (95% IC; 65,8%-73,1%) de gestación de localización desconocida como bajo riesgo de complicaciones, con un VPP del 97,5%. La sensibilidad fue del 88% (95% IC; 79,9%-93,2%). Además, demostró superioridad frente a una determinación única de progesterona con el punto de corte < 10 nmol/L, o el ratio de hCG por sí solos.

Este modelo ha sido validado clínicamente como parte de un estudio de cohortes multicéntrico, en el que 835 pacientes con diagnóstico de GLD se manejaron de acuerdo al modelo M4. Este

modelo clasificó a un 70% (585/835) como de bajo riesgo, de las cuales 568 (97%) se confirmó posteriormente como gestación intrauterina o gestación de localización desconocida fallida. De las restantes 17 pacientes erróneamente clasificadas como bajo riesgo ninguna tuvo daños significativos [1,10].

- o Posteriormente se desarrolló un nuevo protocolo de dos pasos con un nuevo modelo de predicción, el **modelo M6**. Este modelo utiliza tanto la hCG sérica como los niveles séricos de progesterona, suponiendo que el uso combinado de ellos mejoraría la clasificación de riesgo de GLD.

El primer escalón seleccionaría las pacientes con GLD de bajo riesgo si los niveles séricos de progesterona son ≤ 2 nmol/L. En estos casos no serían necesarias nuevas determinaciones de hCG o nuevas ecografías, sino únicamente un test de gestación en orina que confirmaría un resultado negativo en dos semanas.

En el caso de progesterona >2 nmol/L, se llevaría a cabo una determinación del ratio de hCG (hCG a las 48 horas/hCG a las 0 horas) a las 48 horas y se clasificarían utilizando el modelo M6.

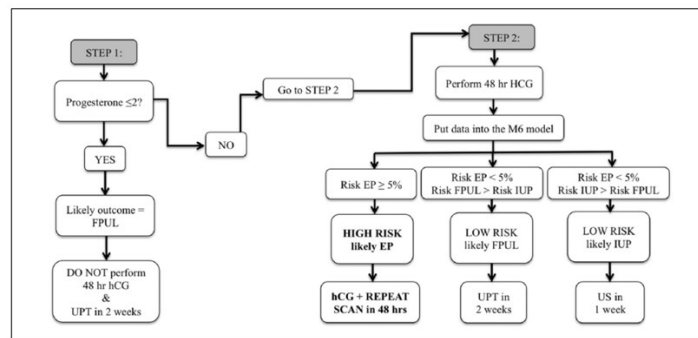


Imagen 6. Modelo M6. Procedente de Bobdiwala et al.2019

Existe además una segunda versión del modelo M6 que no utilizaría el valor inicial de la progesterona sérica como variable en aquellas mujeres que se encuentren en tratamiento con suplementos de progesterona.

En el caso de este test, si el riesgo de embarazo ectópico es $\geq 5\%$, se consideraría de alto riesgo, y se realizarían determinaciones de hCG y ecografía transvaginal cada 48 horas. Si el riesgo es $<5\%$ se realizaría un test de hCG en orina en 2 semanas (si el riesgo de gestación fallida es mayor que el de gestación intrauterina), o bien ecografía transvaginal en una semana (si el riesgo de gestación intrauterina es mayor que el de gestación de localización incierta fallida).

A diferencia del modelo M4, que requeriría un mínimo de dos visitas para todas las pacientes, el modelo M6 utilizaría este nivel

inicial de progesterona para permitir disminuir estas visitas a solo una en algunas ocasiones.

Además el modelo M4 fue desarrollado en una población relativamente pequeña, por ello para mejorar precisión y fiabilidad el modelo M6 fue llevado a cabo en una cohorte mucho mayor, 2753 casos, de los cuales se clasificó un 62,1% como bajo riesgo, con un VPN del 98,6%, y una sensibilidad del 92%.

El modelo M6 se encuentra disponible para el uso clínico mediante este link: www.earlypregnancycare.com/m6, además puede descargarse como una aplicación para smartphones [1,10,14].

Predictors	Enter Values
Initial serum hCG (IU/L)	<input type="text" value="0"/>
48 hour serum hCG (IU/L)	<input type="text" value="0"/>
Did the patient receive progesterone treatment?	<input type="text" value="0"/>
Initial serum progesterone (nmol/L) <i>optional</i>	<input type="text" value="0"/>

calculate Clear

- **Nuevos biomarcadores:** A pesar de que la hCG y la progesterona son los únicos marcadores en uso clínico actual para el manejo de la GLD, presentan algunos límites para la clasificación del riesgo de gestación ectópica.

Esto ha llevado a la búsqueda de numerosos marcadores que puedan ser utilizados en conjunto o bien en sustitución de la hCG y la progesterona.

Los estudios en este campo concluyen que es difícil que un único biomarcador pueda determinar qué GLD presenta alto riesgo de complicaciones. Los trabajos de investigación actuales en este campo se están focalizando principalmente en el desarrollo de test con múltiples biomarcadores séricos que puedan incorporarse a estos modelos de regresión logística.

El estudio de nuevos biomarcadores se basa en 5 áreas clave Cartwright et al. [15].

- Trompa de Falopio: CK, VEGF
- Útero: activina B, factor inhibidor de leucemia (LIF)
- Embrión/trofoblasto: hCG, AFP, PAPP-A, activina A, ADN libre fetal.
- Cuerpo lúteo: progesterona, estradiol, relaxina, inhibina A.
- Irritación/inflamación peritoneal: CA125, IL-6, IL-8, TNF- α

Sin embargo la mayoría de estos estudios son anteriores al año 2012. Algunos de los marcadores que se encuentran en estudio en el momento actual son los siguientes [16]:

- **Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF):** Se trata de un

factor angiogénico conocido, y que supone un importante contribuyente al desarrollo vascular de la unidad feto-placentaria, participando tanto en los procesos de implantación como placentación, y puede verse influenciado por hipoxia y varias citoquinas del ambiente embrionario.

La secreción y expresión del VEGF depende de las condiciones locales como hipoxia, situación en la que se ha visto que su producción se ve aumentada.

Su uso como marcador de gestación ectópica se estudió inicialmente en un estudio de casos y controles llevado a cabo por Daniel Y. Et al. en el año 1999 que incluyó pacientes con gestación ectópica, intrauterina viable e intrauterina alterada. Los resultados fueron los siguientes, niveles ≥ 200 pg/mL tuvieron una sensibilidad del 60% y una especificidad del 90% para gestación ectópica [15].

Estos resultados se confirmaron con un estudio de casos y controles realizado por *Felemban A. Et al* en 2002.

Sin embargo otros grupos no encontraron diferencias en los niveles de VEGF entre gestación ectópica y gestación intrauterina viable y no viable.

Un estudio reciente, publicado en 2022 por *Cabar F. Et al. [7]*, demostró una correlación significativa entre los niveles de B-hCG, progesterona y VEGF ($p < 0,001$).

En este estudio los niveles séricos de VEGF fueron significativamente mayores en pacientes con gestación tubárica en comparación con los demás grupos, mientras que la B-hCG y progesterona presentaron mayor nivel en la gestación intrauterina viable respecto a gestación tubárica e intrauterina alterada ($p < 0,05$).

El nivel de VEGF que mejor predijo la gestación ectópica fue 188,7 ng/ml, con una sensibilidad del 96,7%, y una especificidad del 95%, con un VPP del 90,6% y un VPN de 98,3%.

Este estudio confirmó que tanto la B-hCG como la progesterona diferenciaban entre una gestación viable y no viable, pero no distinguían entre gestación intrauterina y gestación ectópica.

Así, al contrario que la hCG y la progesterona, que son dependientes del trofoblasto, el VEGF sería producido tanto por el trofoblasto como por el endometrio. Esta diferencia sería de extrema importancia ya que la diferencia entre una gestación intra o extrauterina no dependería de la viabilidad del trofoblasto (que se reflejaría mediante niveles bajos de progesterona y hCG), sino que recae sobre el lugar de implantación.

La implantación en un ambiente extrauterino es muy diferente del endometrio, y estas condiciones de hipoxia serían la principal causa de aumento de la producción de VEGF.

El estudio de *Cabar F. et al. [7]* demostró que un nivel de $VEGF > 200$ ng/ml podría distinguir entre gestación intrauterina y extrauterina con una especificidad del 90% y un VPP del 86%, y una gestación intrauterina alterada de una extrauterina con una especificidad del 80% y un VPP del 86%.

Este estudio concluye que el VEGF podría ser un marcador más específico para diferenciar gestación intra o extrauterina.

- El **CA-125** es un biomarcador típico indicativo de cáncer de ovario, aunque sus niveles pueden elevarse en presencia de enfermedades no neoplásicas, incluyendo enfermedad inflamatoria pélvica, leiomioma, endometriosis y embarazo. También se ha demostrado que el CA-125 puede utilizarse de forma conjunta con la B-hCG para distinguir entre aborto tubárico o gestación evolutiva. El pico de CA-125 se observa típicamente en suero materno en el posparto, probablemente causado por la destrucción de los tejidos deciduales. Los estudios con CA-125 presentan datos conflictivos, con algunos de ellos mostrando niveles incrementados en la gestación ectópica [18], mientras que otros mostraron niveles disminuidos, y otros no mostraron diferencias significativas tanto retrospectivo como prospectivo. En el estudio desarrollado por *Haiyan et al.* en 2019 [19], se estudiaron 100 pacientes con gestación ectópica y 100 pacientes con gestación normal. Estos autores objetivaron unos niveles de CA-125 relativamente menores en mujeres con gestación ectópica, en comparación con gestaciones intrauterinas viables, mientras que el porcentaje de células CD3+ T se encontraba incrementado en éstas últimas. ($P < 0,01$). Este estudio concluye que el uso conjunto de progesterona, B-hCG, CA-125 y niveles de CD3+T podrían utilizarse como un indicador fiable del diagnóstico de gestación ectópica (Puntos de corte: progesterona $< 13,65$, B-hCG < 3036 , CA-125 < 45) [19].
- **Test de múltiples marcadores:** Dada la complejidad del proceso tanto en el establecimiento y el mantenimiento de una gestación viable, es complicado que un marcador único sea capaz de predecir los resultados de una gestación de localización desconocida con suficiente precisión. Por ello, en la actualidad se estudian modelos de predicción que incorporen múltiples marcadores. Un estudio de casos y controles que incluyó 200 pacientes con gestación ectópica o gestación intrauterina viable, demostró que un test con 4 biomarcadores, incluyendo progesterona, VEGF, inhibin A y activina A podría predecir la gestación ectópica con una precisión del 100% en aquellos casos con una hCG < 1500 mUI/ml [20].
- **Calponina 2:** la calponina 2 (CNN2) es una calmodulina cuyo nivel puede variar en un embarazo ectópico. La proteína CNN2 se suele expresar de forma más abundante en células que se encuentran bajo tensión mecánica, como células epiteliales, endoteliales, de músculo liso, o en paredes de órganos. El aumento de CNN2 en la trompa en pacientes con embarazo ectópico podría deberse a un aumento de la presión causada por la implantación del embrión, mayor que en la cavidad uterina durante la

gestación intrauterina y el aborto.

Dado que se trata de una proteína secretada, puede medirse en circulación materna. Además puede ser utilizado como un biomarcador de cáncer de mama.

Los niveles de CNN2 pueden discriminar entre un embarazo ectópico y una gestación intrauterina viable con una sensibilidad del 85,2% y una especificidad del 93,7%.

En el estudio realizado por *Zhang R. Et al.* en 2021 [21] se encontró una expresión elevada de CNN2 en células estromales del embarazo ectópico en comparación con embarazos intrauterinos o abortos, por lo que concluye que podría diferenciar el embarazo ectópico de los demás con una buena sensibilidad y especificidad.

Se demostró que un nivel sérico de 66,96ng/ml de CNN2 tenía una sensibilidad del 90,48% (95% IC; 82,09%-95,8%) y una especificidad del 90,12% (95% IC; 81,46%-95,64), mientras que en el caso de la hCG, para una sensibilidad de 90% y 95% tenía una especificidad del 51,85% y 46,91% respectivamente.

En las mujeres con gestación ectópica la concentración sérica de CNN2 fue mayor que en aquellas con gestación intrauterina viable y abortos. La CNN2 sérica predijo el embarazo ectópico respecto a la gestación intrauterina viable y del aborto con áreas bajo la curva (AUCs) de 0,931 (95% IC; 0,889–0,975). Para discriminar la gestación ectópica solo frente al aborto, el AUC fue de 0.906 (95% IC; 0,835-0,977). Por el contrario, las AUCs para la gonadotropina coriónica humana fueron de 0,809 y 0,637, respectivamente.

Por tanto la CNN2 demostró una ganancia significativa en el diagnóstico de gestación ectópica ($p < 0,1$).

En el momento actual se están reclutando pacientes para un ensayo clínico prospectivo multi-institucional que está previsto que finalice en 2025. Son necesarios más estudios antes de que el CNN2 sérico pueda ser utilizado de forma independiente en la práctica clínica [21].

- Reconociendo que las vías relacionadas con el fallo precoz de la gestación son completamente desconocidas, las vías de **proteómica** también han sido estudiadas.

En el estudio publicado por *Dan Ma et al.* [22] en la revista *Nature* en 2022 se incluyeron 36 pacientes con gestación ectópica y 36 pacientes con gestación intrauterina, y demostró que la combinación de GSTO1/ECM-1/-hCG mostró diferencias significativas entre los grupos de gestación ectópica y gestación intrauterina, con un área bajo la curva de 0,93 (95% IC; 0,88-0,99), una sensibilidad de 88,89% (95% IC; 73,94-96,89) y una especificidad de 86,11% (95% IC; 70,50-95,33), por lo que concluyen que la combinación de estas tres proteínas podría ser potencialmente útil como marcador precoz de gestación ectópica, aunque serían necesarios estudios desarrollados en una mayor muestra poblacional para confirmar estos resultados [22].

- **Micro ARN (miARNs):** se trata de pequeños fragmentos de ARN (ácido ribonucleico), (18 a 25 nucleótidos) que no codifican proteínas, sino que actúan como reguladores post-transcripción de muchos genes mediante la unión de secuencias complementarias de ARN. Intervienen en múltiples procesos biológicos como por ejemplo la apoptosis, proliferación celular, sepsis o enfermedades autoinmunes.

Dado que los miARN se encuentran involucrados en la formación embrionaria, desarrollo e implantación, y a la vez se encuentran estables en sangre materna, su concentración podría reflejar situaciones patológicas, con algunos estudios recientes que informan de resultados adversos perinatales acompañados de alteraciones en los niveles de miARNs.

Los miARNs 21 y 141 se expresan en tejido placentario y pueden ser detectados en altos niveles en la circulación materna, por lo que están comenzando a estudiarse como posibles biomarcadores de predicción o diagnóstico de preeclampsia, restricción de crecimiento intrauterino o pérdida gestacional precoz. [23]

Un estudio de mujeres con gestación de localización incierta demostró que el miR-323-3p era significativamente mayor en pacientes diagnosticadas de embarazo ectópico respecto a gestación intrauterina, con una sensibilidad del 30% y una especificidad del 90% [24]. Este estudio concluyó también que la combinación de miR-323-3p con hCG y progesterona aumentaría la sensibilidad a un 96,3%, con una especificidad del 72,6%. Por lo que, aunque de forma independiente no sería útil, en combinación con otros marcadores podría utilizarse como marcador aceptable de localización extrauterina.

En el año 2017, *Liu et al.* presentaron un estudio en el que se analizaron 21 miRNAs en 36 pacientes con gestación intrauterina viable, 30 con aborto espontáneo y 34 con gestación ectópica. De los 21 miRNAs estudiados, el miR-873 y miR-223 fueron significativamente inferiores en las pacientes con gestación ectópica, mientras que el miR-323 fue significativamente mayor en estas pacientes. El miR-873 presentó una sensibilidad del 61,76%, y al combinarse con hCG y progesterona aumentaba hasta un 79,41%, con una especificidad del 90%. Por lo que en este estudio los autores sugieren el miR-873 como un posible biomarcador para la detección precoz de gestación ectópica.

La expresión de varios miARN circulantes han demostrado ser biomarcadores novedosos para el diagnóstico de gestación ectópica con múltiples ventajas respecto a los test previos, ya que se encuentran relativamente estables y presentan un claro patrón diferencial de expresión del tejido embrionario en tejido normal y ectópico. Por ello se piensa que los miARN podrían suponer una revolución no sólo en el diagnóstico de gestación ectópica, sino

también en la monitorización fetal durante el embarazo.

Sin embargo son necesarios más estudios para alcanzar conclusiones más seguras que nos permitan incorporar dicha técnica a la práctica clínica [23].

En resumen, la introducción de marcadores novedosos para la detección de la gestación precoz fallida podría afectar de forma importante a los cuidados clínicos. Existe un número importante de biomarcadores prometedores para su uso en mujeres en riesgo para gestación ectópica o de localización desconocida.

Un panel de marcadores exitoso será aquel que contenga marcadores que informen tanto de viabilidad como de localización de la implantación.

Sin embargo, la mayoría de marcadores aún no se encuentran listos para su uso clínico y deberán ser validados en cohortes representativas tanto de gestación ectópica, gestación intrauterina evolutiva, no evolutiva y gestaciones de localización desconocida en resolución.

Tratamiento

No existe consenso acerca del manejo. Como protocolo se debe tener en cuenta los datos clínicos (terapia de reproducción asistida, gestación ectópica previa, que tendrían un mayor riesgo), la disponibilidad de recursos y la posibilidad de seguimiento.

Es importante no tratar en la primera visita, salvo en casos excepcionales, como umbral de B hCG elevado, mayor de 3500, y debe informarse a la paciente de la posibilidad baja de gestación evolutiva.

Se debe realizar un seguimiento de la paciente hasta llegar al diagnóstico final, y será recomendable basarse en determinaciones seriadas de BhCG (de forma opcional podríamos añadir progesterona), junto a ecografía cada 48 horas, al menos en casos de alto riesgo clínico o analítico.

El manejo de este tipo de pacientes precisa de seguimiento estrecho con valores seriados de hCG, ecografías e incluso evacuación uterina.

Durante el curso de la evaluación de una mujer con gestación de localización desconocida, hasta un tercio presentará valores de hCG que no aumentan ni disminuyen. Este tipo de pacientes presentan un riesgo alto de embarazo ectópico (hasta un 50% de estos casos serán gestaciones extrauterinas), sin embargo, la posibilidad de ruptura en estos casos suele ser baja, por lo que no existe consenso en su manejo.

- **Cirugía:** En ocasiones puede realizarse una exploración quirúrgica mediante una evacuación uterina (dilatación y curetaje), que se realiza para confirmar la presencia de tejido trofoblástico. Si se encuentra tejido trofoblástico durante la intervención se realizará el diagnóstico y tratamiento de aborto. Si la hCG no disminuye tras la evacuación

uterina, se presupone que el tejido trofoblástico se encuentra fuera de la cavidad uterina, y se realizaría un diagnóstico indirecto de gestación ectópica. Este embarazo ectópico “no visualizado” podría tratarse con metotrexato en caso de cumplir los requerimientos clínicos. Sin embargo, en los caso de GLD, la evacuación uterina debería ser una excepción y realizarse únicamente tras haber excluido la posibilidad de una gestación intrauterina viable.

Actualmente, la laparoscopia se reserva para casos de GLD con síntomas o signos de hemoperitoneo

- **Metotrexate:** Se utiliza en los casos de GLD persistente en pacientes clínicamente estables en los que se presupone que tienen una gestación ectópica. En función de las preferencias de la paciente, el metotrexato puede ser ofrecido como una alternativa a la evacuación uterina. Se trata de un agente quimioterápico antagonista del ácido fólico y muestra una alta tasa de éxito en los casos de embarazo ectópico. Se administraría una dosis de 50mg/m² de forma intramuscular, y, en el caso de que la hCG no descienda al menos un 15% entre los días 4 y 7, se repetiría la misma dosis. Antes de iniciar el tratamiento con MTX es importante realizar una analítica de sangre con urea, creatinina, enzimas hepáticas y hemograma. Como consecuencia del poder teratogénico del fármaco la paciente debería esperar al menos 3 meses para intentar volver a quedarse embarazada. Es importante descartar previamente una gestación intrauterina, ya que su uso podría llevar a malformaciones congénitas, abortos e incluso interrupciones de gestaciones deseadas. [10]
- Otra forma de tratamiento, tanto para el aborto precoz como para el embarazo ectópico precoz podría ser el **manejo expectante**.

El ensayo clínico ACT or NOT [9], es un estudio aleatorizado, multicéntrico, diseñado para identificar el manejo óptimo de mujeres con una gestación de localización desconocida persistente.

En este estudio se aleatorizaron 255 pacientes con una media de edad de 31 años en 3 ramas (ratio 1:1:1):

1. Manejo expectante
2. Tratamiento activo A: Evacuación uterina seguida de metotrexato 50mg/m² en caso de que persistieran los niveles de hCG tras la evacuación uterina.
3. Tratamiento activo B: tratamiento empírico con metotrexate.

Completaron el estudio 253 pacientes (99,2%). Del total de pacientes que se incluyeron en el estudio, 99 de ellas, es decir, un 39%, rechazaron el

tratamiento inicial al que habían sido asignadas, optando por otra de las opciones terapéuticas, siendo la preferencia de la mayoría de éstas el manejo expectante, de forma que 107 pacientes recibieron tratamiento expectante, 62 pacientes fueron sometidas a evacuación uterina, y 84 pacientes recibieron tratamiento únicamente con metotrexato.

Las pacientes que recibieron tratamiento activo (169) presentaron una mayor tasa de éxito sin cambios en la estrategia inicial de tratamiento frente a aquellas con manejo expectante (51,5% vs 36,0%; con una diferencia del 15,4% [95% IC, 2,8%- 28,1%]. Entre las estrategias de tratamiento activo, el tratamiento empírico con metotrexato fue no inferior a la evacuación uterina 54,9% vs 48,3%; diferencia del 6,6%.

Por tanto, en este ensayo clínico el manejo activo fue más efectivo que el tratamiento expectante en conseguir la resolución de un embarazo de localización desconocida persistente, sin necesidad de modificar la estrategia inicial. [25]

CONCLUSIÓN

Las mujeres con GLD deberían seguirse hasta llegar a un diagnóstico definitivo.

Afortunadamente la mayoría de casos serán de bajo riesgo y podrán ser monitorizados mediante manejo expectante con ecografía y hCG sérica, además de los niveles de progesterona.

Sin embargo existe la posibilidad de una gestación ectópica, que tiene una alta tasa de morbimortalidad.

Son necesarios estudios para elaborar algoritmos que permitan minimizar los exámenes de laboratorio y visitas de seguimiento, reduciendo de esta forma tanto los costes como el estrés que genera en las pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Águeda J, Arenas J., Gómez P., Pelayo I. Serra V. Gestación precoz. Pérdida gestacional temprana. Gestación de localización no conocida. Guía de asistencia práctica de la sección de ecografía obstétrico-ginecológica de la SEGO. 2021.
2. MacKenzie A. Et al. Prenatal assesment of gestational age, date of delivery, and fetal weight. Uptodate. 2022.
3. Laing FC, Frates MC. Ultrasound evaluation during the first trimester of pregnancy. In: Ultrasonography in Obstetrics and Gynecology, 4th ed, Callen PW (Ed), WB Saunders Co. 2000.
4. Detti et al. Pilot study establishing a nomogram of yolk sac growth during the first trimester of pregnancy. The journal of Obstetrics and Gynaecology research. 2019.
5. Goldstein SR, Kerényi T, Scher J, Papp C. Correlation between karyotype and ultrasound findings in patients with failed early pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1996; 8: 14-317.
6. Yoneda S, Shiozaki A, Yoneda N. A yolk sac larger than 5 mm suggests an abnormal fetal karyotype, whereas an absent embryo indicates a normal fetal karyotype. *J Ultrasound Med* 2018; 37: 1233-1241.
7. Dooley W. Et al. Predictive value of presence of amniotic sac without visible embryonic heartbeat in diagnosis of early embrionic demise. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2021; 57:149-154.
8. Benson CB, Doubilet PM. Fetal measurements-normal and abnormal fetal growth. In: *Diagnostic Ultrasound*, 2nd ed, Rumack CM, Wilson SR, Charboneau JW (Eds), CV Mosby, St.Louis 1998. Vol 2, p.1013.
9. Barnhart K et al. Optimal treatment for women with a persisting pregnancy of unknown location, a randomized controlled trial: the ACT-or-NOT trial. *Contemporary Clinical Trials*. 2018; 73, 145-151.
10. Pereira et al. Pregnancy of unknow location. *Clinics*. 2019.
11. Barnhart KT, Guo W, Cary MS, Morse CB, Chung K, Takacs P, et al. Differences in Serum Human Chorionic Gonadotropin Rise in EarlyPregnancy by Race and Value at Presentation. *Obstet Gynecol*. 2016; 128(3):504-11.
12. Van Mello NM, Mol F, Opmeer BC, Ankum WM, Barnhart K, Coomarasamy A, et al. Diagnostic value of serum hCG on the outcome of pregnancy of unknown location: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2012;18(6):603-17.
13. Cordina M, Schramm-Gajraj K, Ross JA, Lautman K, Jurkovic D. Introduction of a single visit protocol in the management of selected patients with pregnancy of unknown location: a prospective study. *BJOG*. 2011; 118(6):693-7.
14. Bobdiwala et al. Triaging women with pregnancy of unknown location using two-step protocol including M6 model: clinical implementation study. 2019; Volume 55, 1; 105-114.
15. Bobdiwala S., Al-Memar M., Farren J., Bourne T. Factors to consider in pregnancy of unknown location. *Women's health* 2017; Vol 13(2)27-33.
16. Senapati S, Barnhart K. Biomarkers for ectopic pregnancy and pregnancy of unknown location. *Fertil Steril*. M3, 15;99 (4): 1107-1116.

17. Cabar F., Pereira P, Abelo M, Pulcinelli R, Francisco V. Serum vascular endothelial growth factor as a marker for tubal pregnancy. *Rev Assoc Med Bras.* 2022;68 (6):860-865.
18. Sadovsky Y, Pineda J, Collins JL. Serum CA-125 levels in women with ectopic and intrauterine pregnancies. *J Reprod Med.* 1991; 36:875-8.
19. Haiyan Li, Ying Liu, Shubin Wen, Hanbing Jia, Yuanjie Du. Evaluation of serum biomarkers and efficacy of MTX in women with ectopic pregnancy. *Molecular Medicine Reports.* 2019; 2902-2908.
20. Senapati S, Barnhart K. Biomarkers for ectopic pregnancy and pregnancy of unknown location. *Fertil Steril.* 2013; 15;99 (4): 1107-1116.
21. Zhang R. Et al. Serum calponin 2 is a novel biomarker of tubal ectopic pregnancy. *Original articles: early pregnancy.* 2021; 116: 1020-27.
22. Dan Ma. Et al. Identification of noninvasive diagnostic biomarkers for ectopic pregnancy using data-independent acquisition (DIA) proteomics: a pilot study. *Scientific reports.* 2022; 12:19992.
23. Kontomanolis E, Kalagasidou S, Fasoulakis Z. MicroRNAs as potential serum biomarkers for early detection of ectopic pregnancy, *Cureus.* 2018
24. Zhao Z, Zhao Q, Warrick J, Lockwood CM, Woodworth A, Moley KH, et al. Circulating microRNA miR-323-3p as a biomarker of ectopic pregnancy. *Clin Chem.* 2012; 58:896-905.
25. Barnhart et al. Effect of an active vs expectant management strategy on successful resolution of pregnancy among patients with a persisting pregnancy of unknown location, the ACT or NOT randomized clinical trial. *JAMA.* 2021; 326 (5): 390-400.
26. McKenna KM, Feldstein VA, Goldstein RB, Filly RA. The empty amnion: a sign of early pregnancy failure. *J Ultrasound Med* 1995; 14: 117–121.
27. Barnhart K., Speicher D. Molecular diagnosis of ectopic pregnancy. *Expert review of molecular diagnostics.* 2014; 11:8, 759-762.
28. Protocolo Gestación de localización incierta (PUL). Hospital Clínic/Hospital Sant Joan de Déu/Universitat de Barcelona. 2021.