



clínica e investigación en ginecología y obstetricia

www.elsevier.es/gine



REVISIÓN DE CONJUNTO

Detección de ácidos nucleicos fetales en plasma materno: hacia un diagnóstico prenatal no invasivo

P. Ayala-Ramírez*, R. García-Robles, J. Bernal y M. Bermúdez

Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina- Pontificia, Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

Recibido el 25 de febrero de 2010; aceptado el 2 de mayo de 2011

Disponible en Internet el 27 de octubre de 2011

PALABRAS CLAVE

ADN fetal libre;
ARN fetal libre;
Embarazo;
Diagnóstico prenatal

KEYWORDS

Free fetal DNA;
Free fetal RNA;
Pregnancy;
Prenatal diagnosis

Resumen A partir del descubrimiento de la presencia de ácidos nucleicos fetales libres circulantes en el plasma materno se ha generado un gran interés sobre su origen, naturaleza y posibles usos médicos. En este artículo de revisión realizamos un amplio y conciso resumen sobre los resultados de los estudios de ADN y ARN fetal libre en plasma materno, sus perspectivas futuras, principalmente orientadas hacia el diagnóstico prenatal no invasivo, área donde se espera un impacto importante en el futuro inmediato. También se reportan resultados prometedores en la evaluación de la función placentaria y como marcadores predictores y de severidad en complicaciones del embarazo.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Detection of fetal nucleic acids in maternal plasma: toward a non-invasive prenatal diagnosis

Abstract The discovery of circulating free fetal nucleic acids in maternal plasma has sparked wide interest in their origin, characteristics and possible medical uses. This review provides a comprehensive and concise summary of the results of studies of free fetal DNA and RNA in maternal plasma and discusses future possibilities for their use, mainly aimed at non-invasive prenatal diagnosis, an area where this discovery is expected to have a major impact in the very near future. Promising results have been reported in the assessment of placental function and in the use of these nucleic acids as predictive markers of the severity of pregnancy complications.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Hoy en día el diagnóstico prenatal requiere de muestras de células fetales obtenidas por vías invasivas, como amniocentesis y toma de muestras de vellosidad coriónica. Estos procedimientos invasivos representan un riesgo para la madre y el feto¹. Para evitar este riesgo potencial, se han

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: payala@javeriana.edu.co
(P. Ayala-Ramírez).

desarrollados métodos de genética para el diagnóstico prenatal. Estudios previos han encontrado ácidos nucleicos libres en el plasma de sujetos normales², en pacientes con cáncer³ y mujeres embarazadas^{4,5}. Este último proveniente de células trofoblásticas⁶ debido al tráfico celular entre el feto y la madre⁷. Estos ácidos nucleicos pueden permitir una alternativa segura y precisa de métodos de diagnóstico no invasivo. En los últimos años, se ha realizado un gran progreso en esta área. En particular, los estudios se han encaminado en detectar ADN y ARN del feto, en el plasma materno, además la utilización de la técnica de PCR en tiempo real (QRT-PCR) ha permitido detectar niveles muy bajos de estas moléculas⁸. En este artículo de revisión, hacemos un breve resumen de los estudios que se han llevado a cabo en esta área y las ventajas que representa.

ADN fetal libre en plasma materno

A raíz del descubrimiento del paso de células fetales a la sangre materna⁹, se comenzó a estudiar si además de células también se podía aislar material genético libre en plasma materno. En 1948 se publicó la primera evidencia de ácidos nucleicos en plasma y orina¹⁰. Este trabajo no fue valorado por muchos años hasta que otros investigadores encontraron estas moléculas plasmáticas en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES)^{11,12}, artritis reumatoidea¹³ y cáncer^{3,14-18}. Todavía se desconoce el mecanismo por el cual el ADN es liberado al suero y plasma. Ha sido postulado que en LES, las células multinucleadas sensibilizadas liberan su ADN endógeno aumentando el ADN circulante en plasma. Adicionalmente, los neutrófilos apoptóticos circulantes podrían contribuir al aumento en los niveles de ADN de doble cadena libre¹⁹. Similarmente en malignidad, el ADN libre en plasma probablemente proviene de la apoptosis de células cancerígenas y normales. Otra teoría postula que la destrucción celular debido a la radioterapia podría liberar el ADN al plasma²⁰.

En 1997, Lo et al lograron aislar ADN libre circulante en el plasma de mujeres embarazadas⁴. Estos estudios abrieron una nueva posibilidad de realizar un diagnóstico prenatal no invasivo donde ni el feto ni la madre puedan correr ningún peligro²¹. El mecanismo por el cual el ADN de origen fetoplacentario es liberado al plasma es desconocido, aunque se piensa que la muerte celular programada (apoptosis) puede estar involucrada^{22,23}.

En los últimos años, se han desarrollado nuevos ensayos para aislar y analizar ADN fetal en plasma materno obteniéndose un avance rápido en estas áreas^{4,24-26}. Existen varias ventajas al utilizar ADN fetal libre en plasma. La primera ventaja es que sorprendentemente este se encuentra en muy altas concentraciones durante el embarazo^{4,24}. La alta concentración de ADN fetal en plasma materno hace del plasma materno una fuente de fácil acceso para el diagnóstico prenatal no invasivo. En segundo lugar, la desaparición del ADN fetal libre en circulación materna es extremadamente rápida. La vida media del ADN fetal libre se ha determinado en 16,3 min (4-30 min)²⁷. Por lo tanto, el ADN fetal en plasma materno podría ser utilizado como un marcador en tiempo real para monitorización fisiológica y patológica tanto del feto como de la madre. Tercero, métodos como la PCR y sus derivados son altamente sensibles

para la detección de ADN plasmático libre^{4,25}. Cuarto, se ha demostrado que este ADN puede ser detectado desde la 5.^a semana de embarazo, lo que lo haría útil en diagnóstico de patologías fetales mucho antes de que puedan ser detectadas por ultrasonido o posterior al nacimiento²⁸. Recientemente se ha utilizado la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) para medir la cantidad de ADN fetal libre en plasma. Es así como con esta técnica se ha podido determinar el sexo fetal en mujeres con fetos masculinos, evaluando el gen *SRY*^{4,24,29}, hallazgo de mucha utilidad en el diagnóstico de las enfermedades ligadas al sexo. Una de las utilidades más importantes es en la determinación del genotipo Rh D fetal en mujeres Rh D negativas³⁰, esta prueba ya ha sido introducida como un servicio de rutina por el Servicio Nacional de Sangre Británico desde 2001³¹. También se ha utilizado en la detección de polimorfismos en los cromosomas 13, 18 y 21 para el diagnóstico de trisomías³², diagnóstico prenatal de enfermedades autosómicas recesivas (fibrosis quística³³ e hiperplasia adrenal congénita³⁴) y de autosómicas dominantes (distrofia miotónica, acondroplasia y enfermedad de Huntington)³⁵⁻³⁷. Cabe resaltar que se ha logrado detectar ADN fetal en el plasma de mujeres que han tenido hijos varones muchos años después inclusive décadas después del parto³⁸.

En los últimos años se han desarrollado varias estrategias para aislar el ADN fetal en plasma materno para ser utilizado como marcador en diagnóstico prenatal no invasivo. Se ha descubierto que el tamaño del ADN fetal es menor que el materno³⁹. Este descubrimiento ha permitido un mejor aislamiento del ADN a partir del plasma materno. Por otro lado, también se ha establecido que existen diferencias en la metilación del ADN fetal con respecto al ADN de origen materno. Como es el caso del gen *SERPINB5*, el cual está hipometilado en la placenta e hipermetilado en células de sangre materna⁴⁰. Por lo tanto, el *SERPINB5* hipometilado puede utilizarse como un marcador fetal específico en plasma materno. Debido a que el gen se encuentra en el cromosoma 18, se ha demostrado que el análisis de la razón alélica de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la forma hipometilada del *SERPINB5* puede ser utilizada como un marcador en el plasma materno para el diagnóstico de trisomía 18⁴¹. También se ha demostrado que diferencias en los patrones de metilación pueden ser utilizadas para diagnóstico prenatal no invasivo de trisomía 21 utilizando plasma materno⁴². Otra aproximación hacia la detección de aneuploidías es el desarrollo de métodos cuantitativos altamente discriminatorios, los cuales permiten la detección de secuencias de ADN específicas, incluso si el ADN fetal representa una proporción baja del ADN total libre circulante. Lo et al demostraron que la PCR digital es una muy buena herramienta para este fin⁴³. Es importante destacar que el ADN fetal ha podido ser amplificado y secuenciado con muy buenos resultados⁴⁴⁻⁴⁶.

Adicionalmente, se ha observado que en algunas patologías del embarazo existen anomalías en la concentración de ADN fetal circulante en plasma. La primera enfermedad que fue asociada con estas anomalías fue la preeclampsia, donde se encontró que la concentración de ADN en las gestantes con preeclampsia estaba incrementada cinco veces en comparación con los controles⁴⁷, al parecer por diferencias en el aclaramiento del ADN fetal circulante plasmático⁴⁸. Otras

enfermedades donde se ha visto involucrada la variación en concentración de ADN son: algunas aneuploidías⁴⁹, parto pretérmino⁵⁰, hiperémesis gravídica⁵¹ y placenta invasiva⁵².

ARN fetal libre en plasma materno

A partir de la detección de ADN derivado de tumores en plasma se inició la búsqueda de ARN en el plasma y suero de pacientes con cáncer^{53,54}. Debido a que muchas veces no es posible determinar el origen del ADN encontrado en el plasma de mujeres embarazadas y se puede confundir con el ADN materno, se planteó el interrogante si se podría aislar ARN de origen feto-placentario en el plasma materno y así determinar la expresión de genes específicos de la placenta. Poon et al fueron los primeros en publicar la presencia de ARN fetal en el plasma de mujeres embarazadas, mediante la detección de ARNm del gen *ZFY* que se encuentra en el cromosoma Y. Las tasas de detección de ARN fetal en plasma materno al inicio y final de los embarazos fueron 22 y 63%, respectivamente. La menor tasa de detección de ARN al inicio del embarazo con respecto a etapas finales sugiere que la concentración de ARN plasmático fetal es menor en etapas tempranas del embarazo. Esta observación es similar a los resultados que indican que la concentración de ADN fetal en plasma materno se incrementa con el progreso del embarazo⁵⁵. Al estudiar este ARN se encontró que era mucho más estable de lo que se pensaba. Tsui et al investigaron esta aparente paradoja en detalle y reportaron que la molécula de ARN de plasma endógeno eran altamente estables a 4°C por 24 horas en comparación con ARN tisular extraído y purificado². Además al pasar el plasma por filtros de 0,45 µm se encontraban diferencias estadísticamente significativas al medir la expresión del ARNm de la subunidad beta de la hormona gonadotropina coriónica humana (βhCG), lactógeno placentario humano (hPL) y gliceraldehído-6-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), en comparación con plasma no filtrado. Esto sugiere que las moléculas de ARN podrían estar asociadas a algún tipo de estructura celular o membranal que lo protege de su degradación⁸. Adicionalmente, demostró que los transcritos de ARNm derivados de placenta son detectables en plasma materno durante el embarazo y desaparecen rápidamente después del parto. Estos resultados demuestran que la placenta es un órgano importante para liberar ARN fetal en plasma materno. Luego Ng et al demostraron que esas moléculas de ARN de plasma de pacientes con cáncer estaban asociadas con cuerpos apoptóticos que podrían protegerlo de la degradación de las RNAsas^{56,57}, esto podría dar una explicación a la estabilidad de este ARN. A pesar de esta aparente estabilidad, estudios demostraron que la molécula no es un transcrito intacto la cual mostró una mayor degradación en el extremo 3' comparado con el extremo 5'⁵⁸.

A raíz de estos descubrimientos se empezaron a desarrollar diferentes estrategias metodológicas para la evaluación y la medición de transcritos derivados de placenta. Con el fin de buscar un marcador de ARN fetal independiente del género, Ng et al recientemente demostraron que el ARNm expresado en placenta es fácilmente detectable en plasma materno, utilizando ARNm codificante para hPL y βhCG por la técnica de QRT-PCR⁸. En 1999, Vogelshtein y Kinzler propusieron una técnica innovadora llamada

«PCR digital» para cuantificar con una alta precisión una sola molécula de ARN⁵⁹. Esta nueva técnica se ha utilizado para estudios en pacientes con cáncer de ovario⁶⁰ y trisomía 21 fetal⁴³.

En el 2004 Tsui et al compararon los perfiles de expresión génica entre los tejidos de la placenta y de sangre periférica correspondiente de las mujeres embarazadas en su primer y tercer trimestre, por análisis de microarray⁶¹. Esta es una técnica de análisis de ARN plasmático que puede representar una nueva herramienta para el análisis no invasivo de perfiles fetales de expresión génica. Los resultados obtenidos de los estudios de ARN fetal en plasma materno a través de la técnica de microarrays son claves para escoger los transcritos a ser estudiados en diversas patologías del embarazo.

El estudio del ARN fetal circulante en plasma materno se ha encaminado al desarrollo de estrategias para el diagnóstico prenatal de patologías como preeclampsia y algunas aneuploidías⁶². Se espera que se desarrollen nuevos marcadores que permitan acercarnos cada vez más a establecer un diagnóstico prenatal no invasivo utilizando marcadores de ARNm.

ARN de origen feto-placentario en plasma materno en el diagnóstico prenatal de patologías fetales

Para desarrollar marcadores para diagnóstico prenatal de trisomía 21 se estudió el gen *LOC90625* el cual se encuentra en el cromosoma 21 y se detecta en un 100% cuando se trabaja con 1600 µl de plasma en el primer trimestre, por lo tanto puede ser utilizado como marcador para diagnóstico prenatal de síndrome de Down⁶³. Adicionalmente, se ha estudiado si las concentraciones de ARNm en plasma podrían ser un marcador para trisomías. Por este motivo Ng et al realizaron un estudio en donde se evaluaron los niveles de ARNm de la βhCG en mujeres con fetos con trisomía 18 y 21 durante el primer trimestre del embarazo. Los resultados mostraron que había diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de ARNm en plasma de mujeres con trisomía 18 y controles ($p < 0,05$), con concentraciones 9,4 veces menores en mujeres con fetos con trisomía 18⁶². Por lo tanto, las concentraciones de ARNm varían en algunas patologías y podrían servir como marcadores para un diagnóstico prenatal no invasivo o inclusive como factores predictores de la ocurrencia y severidad de enfermedades del embarazo (tabla 1).

Una estrategia que se desarrolló recientemente es la determinación de la razón alélica para diagnóstico de algunas aneuploidías. Esta estrategia es llamada aproximación de la «razón alélica de un SNP de ARN» y se realiza con espectrometría de masas; los resultados han mostrado una alta sensibilidad y especificidad estudiando el gen *PLAC4* en pacientes con fetos con trisomía 21^{64,65} y el gen *SERPINB2* en trisomía 18⁶⁶. La limitación que tiene esta técnica es que únicamente se pueden analizar fetos heterocigotos para el SNP analizado. Para eliminar esta limitación se deberían analizar múltiples SNP.

Adicionalmente, Alcelli et al estudiaron la expresión de genes involucrados en el desarrollo anormal del corazón encontrando diferencias estadísticamente significativas

Tabla 1 Estudios que reportan el uso de mRNA circulante derivado de placenta para estudio de aneuploidías y complicaciones del embarazo

ESTUDIO	EDAD DE GESTACIÓN (semanas)	GENES ESTUDIADOS	ENFERMEDAD ESTUDIADA	TÉCNICA	RESULTADO
ANEUPLOIDÍAS					
Tsui et al. 2010	Media: 12,9	<i>PLAC4</i>	Trisomía 21	Espectrometría de masas y PCR ^a digital	Sensibilidad diagnóstica del 100% y especificidad diagnóstica del 89,7%
Arcelli et al. 2010.	Rango: 20-22	Genes involucrados en desarrollo anormal del corazón	Cardiopatías congénitas	Microarray y QRT-PCR	Sensibilidad diagnóstica del 42% y especificidad diagnóstica del 95%. Con una tasa de falsos positivos del 10%
Tsui et al. 2009	Media: 15	<i>SERPINB2</i>	Trisomía 18	Espectrometría de masas	Detección de trisomía 18 en todos los casos
Lo et al. 2007	Media: 14,7	<i>PLAC4</i>	Trisomía 21	Espectrometría de masas	Sensibilidad diagnóstica del 90% y especificidad diagnóstica del 96,5%
Ng et al. 2004	Media 12,5	<i>βhCG</i>	Trisomía 18 y 21	QRT-PCR	Niveles más bajos en trisomía 18, con diferencias estadísticamente significativas
Oudejans et al. 2003	Rango: 9-13	<i>LOC90625, PTTG1IP, DSCR4</i>	Trisomía 21	RT-PCR ^b Secuenciación	Detección LOC90625 en 100% de las muestras utilizando 1.600 μl de plasma
PATOLOGÍAS DEL EMBARAZO					
Pang et al. 2005	Rango: 16-40	<i>CSH1, GH2, KISS1, and ADAM12</i>	RCIU	QRT-PCR	GH2 correlacionado con peso al nacimiento y medidas biométricas y ADAM12 con gestantes con RCIU y preeclampsia
Masuzaki et al. 2005	37 ^c	<i>βhCG, hPL, GAPDH</i>	Placenta previa-percreta	QRT-PCR	Marcadores sensibles para monitorear apoptosis en la placenta y anomalías en la invasión del trofoblasto
Purwosunu et al. 2009	Rango: 15-20	Panel de <i>mRNAs</i>	Preeclampsia	QRT-PCR	Incremento de los niveles de FLT1, VEGFA, endoglin, PLAT, SERPINE1, PLAC1, y SELP son buenos predictores de la ocurrencia de preeclampsia
Shimizu et al. 2009	Rango 15-20	<i>PP13</i>	Preeclampsia	QRT-PCR	Buen marcador para predecir preeclampsia
Purwosunu et al. 2007	Media: 39	<i>PAI-1 y tPA</i>	Preeclampsia	QRT-PCR	Los niveles de PAI-1 y tPA se encuentran aumentados con diferencias estadísticamente significativas
Farina et al. 2006	Media: 32	Panel de <i>RNAm</i>	Preeclampsia	QRT-PCR	Diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles
Ng et al. 2003	Media: 37	<i>CRH</i>	Preeclampsia	QRT-PCR	CRH buen marcador de preeclampsia con diferencias estadísticamente significativas

^a Reacción en cadena de la polimerasa.

^b PCR en tiempo real.

^c Se tomaron muestras antes y después de las cirugías que se realizaron en la semana 37 y 75 días después.

entre los niveles encontrados en plasma de mujeres con fetos diagnosticados con cardiopatías congénitas comparados con controles normales⁶⁷.

ARN de origen feto-placentario en plasma materno en complicaciones del embarazo

También se han reportado diferencias en los niveles de ARN fetal en plasma materno en complicaciones del embarazo como placenta previa, restricción de crecimiento intrauterino (RCIU) y preeclampsia.

Debido a estudios realizados en preeclampsia con ADN fetal plasmático, se pensó que el ARNm también podría estar involucrado en esta patología. Por este motivo, Ng et al estudiaron la expresión del gen de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en mujeres con preeclampsia en el tercer trimestre. Se encontró que la expresión de CRH se encontraba disminuida en mujeres con preeclampsia comparado con los controles⁶⁸. En el 2006, Farina et al⁶⁹ estudiaron la expresión de un panel de ARNm y encontraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con los controles en los transcritos de hPL, inhibina A, KISS-1, proteína plasmática asociada a embarazo (PAPP-A), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), selectina-P y receptor del factor del crecimiento vascular endotelial (VEGFR) y a raíz de estos resultados se analizó si era posible predecir la preeclampsia en mujeres asintomáticas midiendo la expresión de la proteína placentaria 13 (PP13), dando como resultado diferencias estadísticamente significativas entre mujeres asintomáticas que desarrollaron preeclampsia y controles sanos⁷⁰. Adicionalmente, se han estudiado los genes involucrados en la coagulación activador de plasminógeno tisular (tPA) y PAI-1, y se encontró que su expresión está significativamente incrementada en pacientes con preeclampsia ($p < 0,0001$)⁷¹. Purwosunu et al (2009) evaluaron los niveles de ARNm de PAI-1, tPA, factor de crecimiento endotelial vascular, receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular, endoglina, gen específico de placenta-1 y selectina P en mujeres con y sin preeclampsia. Se encontró que la expresión de todos los genes evaluados estaba aumentada en el plasma de pacientes con preeclampsia y la expresión génica de todos los genes evaluados se correlaciona positivamente con la severidad de la enfermedad⁷².

Adicionalmente, en RCIU se ha reportado que la concentración de ARNm de la hormona del crecimiento (GH2) se correlaciona de manera estadísticamente significativa con el peso al nacer y las medidas biométricas fetales. Además, la concentración de ARNm de ADAM12 se encontró aumentada en gestantes con RCIU y preeclampsia con diferencias estadísticamente significativas comparado con las pacientes normales⁷³.

Masuzaki et al encontraron que los niveles de ARNm de los genes β hCG y hPL disminuyen y aumentan, respectivamente, en pacientes con placenta previa⁷⁴.

Discusión

El estudio de los ácidos nucleicos fetales libres circulantes en el plasma materno abre nuevas posibilidades para estrategias en la detección de condiciones fetales que predispongan a enfermedad, diagnóstico prenatal no inva-

sivo, determinación de riesgo para sufrir complicaciones del embarazo y severidad de la patología. También muy importante es el impacto que ha tenido en la generación de conocimiento sobre la fisiología de la placenta y la regulación de la unidad madre-feto-placenta, es probable que este conocimiento derive en nuevas estrategias en la prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento de patologías fetales y del embarazo. Finalmente, cabe resaltar que el estudio de ARN fetal libre en plasma materno tiene la ventaja de poder determinar perfiles de expresión génica mientras que el análisis de ADN fetal libre en plasma materno tiene la ventaja de poder evaluar epigenéticamente al feto.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Brandenburg H, Jahoda MGJ, Pijpers L, Reuss A, Kleyer WJ, Wladimiroff JW. Fetal loss rate after chorionic villus sampling and subsequent amniocentesis. *Am J Med Genet.* 1990;35:178-80.
2. Tsui NBY, Ng EKO, Lo YMD. Stability of Endogenous and Added RNA in Blood Specimens, Serum, and Plasma. *Clin Chem.* 2002;48:1647-53.
3. Leon S, Shapiro B, Sklaroff D, Yaros M. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res Mar.* 1977;37:646-50.
4. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997;350:485-7.
5. Leo LM, Poon. Circulating Fetal RNA in Maternal Plasma. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;945:207-10.
6. Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn.* 2007;27:415-8.
7. Diana WB. Fetomaternal cell trafficking: A new cause of disease? *Am J Med Genet.* 2000;91:22-8.
8. Ng EK, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW, Panesar NS, et al. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:4748-53.
9. Schmorl G. Pathologisch-anatomische Untersuchungen ueber- Publereklampsie. En: Vogel. ed. Leipzig; 1893.
10. P M, P M.;1; Acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Acad Sci. Vol 142. Paris*1948:241-243.
11. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1966;45:1732-40.
12. Harbeck R, Hoffmann A, Carr R. Studies on the nature of circulating DNA in systemic lupus erythematosus (SLE). *J Rheumatol.* 1975;2:194-203.
13. Lindstedt G, Lundberg P, Iwarsson S, Lindberg J. Circulating heat-labile DNA binder(s) in chronic active hepatitis and rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta.* 1975;62:183-5.
14. Sorenson G, Pribish D, Valone F, Memoli V, Bzik D, Yao S. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994;3:67-71.
15. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol Apr.* 1994;86:774-9.

16. Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Chen XQ, et al. K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology*. 1997;112:1114–20.
17. Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J, et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med*. 1996;2:1033–5.
18. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med*. 1996;2:1035–7.
19. Margraf S, Lögters T, Reipen J, Altrichter J, Scholz M, Windolf J. Neeutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): A potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis. *Shock*. 2008;30:352–8, 3.
20. Lee T, Montalvo L, Chrebtow V, Busch M. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion*. 2001;41:276–82.
21. Bianchi D. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol*. 1999;105:574–83.
22. van Wijk IJ, deHoon AC, Jurhawan R, Tjoa ML, Griffioen S, Mulders MA, et al. Detection of apoptotic fetal cells in plasma of pregnant women. *Clin Chem*. 2000;46:729–31.
23. van Wijk IJ, de Hoon AC, Griffioen S, Mulders MA, Tjoa ML, van Vugt JM, et al. Identification of triploid trophoblast cells in peripheral blood of a woman with a partial hydatidiform molar pregnancy. *Prenat Diagn*. 2001;21:1142–5.
24. Lo YM, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis. *Am J Hum Genet*. 1998;62:768–75.
25. Smid M, Lagona F, De Benassuti L, Ferrari A, Ferrari M, Cremonesi L. Evaluation of different approaches for fetal DNA analysis from maternal plasma and nucleated blood cells. *Clin Chem*. 1999;45:1570–2.
26. Zhong X, Holzgreve W, Hahn S. Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *BJOG*. 2000;107:766–9.
27. Lo YMD, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Hjelm NM. Rapid Clearance of Fetal DNA from Maternal Plasma. *Am J Hum Genet*. 1999;64:218–24.
28. Thomas MR, Tutschek B, Frost A, Rodeck CH, Yazdani N, Craft I, et al. The time of appearance and disappearance of fetal DNA from the maternal circulation. *Prenat Diagn*. 1995;15:641–6.
29. Martinhago CD. Accuracy of fetal gender determination in maternal plasma at 5 and 6 weeks of pregnancy. *Prenat Diagn*. 2006;26:1219–23.
30. Lo YM, Bowell PJ, Selinger M, Mackenzie IZ, Chamberlain P, Gillmer MD, et al. Prenatal determination of fetal rhesus D status by DNA amplification of peripheral blood of rhesus-negative mothers. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;731:229–36.
31. Finning K, Martin P, Soothill P, Avent N. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion*. 2002;42:1079–85.
32. Lo Y. Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic applications. *Clin Chem*. 2000;46:1903–6.
33. González-González MC, García-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, et al. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2002;22:946–8.
34. Chiu R, Lau T, Cheung P, Gong Z, Leung T, Lo Y. Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. *Clin Chem*. 2002;48:778–80.
35. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem*. 2000;46:301–2.
36. Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet*. 2000;356:1170.
37. González-González MC, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, García-Hoyos M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, et al. Huntington disease-affected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn*. 2003;23:232–4.
38. Invernizzi P, Biondi ML, Battezzati PM, Perego F, Selmi C, Cecchini F, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy. *Hum Genet*. 2002;110:587–91.
39. Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, et al. Size Distributions of Maternal and Fetal DNA in Maternal Plasma. *Clin Chem*. 2004;50:88–92.
40. Chim SS, Tong YK, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LY, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:14753–8.
41. Tong YK, Ding C, Chiu RW, Gerovassili A, Chim SS, Leung TY, et al. Noninvasive Prenatal Detection of Fetal Trisomy 18 by Epigenetic Allelic Ratio Analysis in Maternal Plasma: Theoretical and Empirical Considerations. *Clin Chem*. 2006;52:2194–202.
42. Chim SS, Jin S, Lee TY, Lun FM, Lee WS, Chan LY, et al. Systematic Search for Placental DNA-Methylation Markers on Chromosome 21: Toward a Maternal Plasma-Based Epigenetic Test for Fetal Trisomy 21. *Clin Chem*. 2008;54:500–11.
43. Lo YM, Lun FM, Chan KC, Tsui NB, Chong KC, Lau TK, et al. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:13116–21.
44. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:20458–63.
45. Fan H, Blumenfeld Y, Chitkara U, Hudgins L, Quake S. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:16266–71.
46. Korshunova Y, Maloney RK, Lakey N, Citek RW, Bacher B, Budiman A, et al. Massively parallel bisulphite pyrosequencing reveals the molecular complexity of breast cancer-associated cytosine-methylation patterns obtained from tissue and serum DNA. *Genome Res*. 2008;18:19–29.
47. Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem*. 1999;45:184–8.
48. Lau TW, Leung TN, Chan LY, Lau TK, Chan KC, Tam WH, et al. Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia. *Clin Chem*. 2002;48:2141–6.
49. Lo YM, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AM, Hjelm NM, et al. Increased Fetal DNA Concentrations in the Plasma of Pregnant Women Carrying Fetuses with Trisomy 21. *Clin Chem*. 1999;45:1747–51.
50. Leung T, Zhang J, Lau T, Hjelm N, Lo Y. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet*. 1998;352:1904–5.
51. Sekizawa A, Sugito Y, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Hoshi S, et al. Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum. *Clin Chem*. 2001;47:2164–5.
52. Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Sugito Y, Yukimoto Y, et al. Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem*. 2002;48:353–4.
53. Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of Tumor Messenger RNA in the Serum of Patients with Malignant Melanoma. *Clin Cancer Res*. 1999;5:1961–5.
54. Lo YM, Chan LY, Lo KW, Leung SF, Zhang J, Chan AT, et al. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*. 1999;59:1188–91.

55. Poon L, Leung T, Lau T, Lo Y. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2000;46:1832–4.
56. Ng EK, Tsui NB, Lam NY, Chiu RW, Yu SC, Wong SC, et al. Presence of Filterable and Nonfilterable mRNA in the Plasma of Cancer Patients and Healthy Individuals. *Clin Chem*. 2002;48:1212–7.
57. Hasselmann D, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clin Chem*. 2001;47:1488–9.
58. Wong BC, Chiu RW, Tsui NB, Chan KC, Chan LW, Lau TK, et al. Circulating Placental RNA in Maternal Plasma Is Associated with a Preponderance of 5' mRNA Fragments: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis and Monitoring. *Clin Chem*. 2005;51:1786–95.
59. Vogelstein B, Kinzler K. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:9236–41.
60. Chang H, Ali S, Cho S, Kurman R, Shih I. Detection of allelic imbalance in ascitic supernatant by digital single nucleotide polymorphism analysis. *Clin Cancer Res*. 2002;8:2580–5.
61. Tsui NB, Chim SS, Chiu RW, Lau TK, Ng EK, Leung TN, et al. Systematic micro-array based identification of placental mRNA in maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expression profiling. *J Med Genet*. 2004;41:461–7.
62. Ng EK, El-Sheikhah A, Chiu RW, Chan KC, Hogg M, Bindra R, et al. Evaluation of Human Chorionic Gonadotropin {beta}-Subunit mRNA Concentrations in Maternal Serum in Aneuploid Pregnancies: A Feasibility Study. *Clin Chem*. 2004;50:1055–7.
63. Oudejans CB, Go AT, Visser A, Mulders MA, Westerman BA, Blankenstein MA, et al. Detection of Chromosome 21-encoded mRNA of Placental Origin in Maternal Plasma. *Clin Chem*. 2003;49:1445–9.
64. Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Heung MM, et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med*. 2007;13:218–23.
65. Tsui NB, Akolekar R, Chiu RW, Chow KC, Leung TY, Lau TK, et al. Synergy of Total PLAC4 RNA Concentration and Measurement of the RNA Single-Nucleotide Polymorphism Allelic Ratio for the Noninvasive Prenatal Detection of Trisomy 21. *Clin Chem*. 2010;56:73–81.
66. Tsui NBY, Wong BCK, Leung TY, Lau TK, Chiu RWK, Lo YMD. Non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP allelic ratio analysis using maternal plasma SERPINB2 mRNA: a feasibility study. *Prenat Diagn*. 2009;29:1031–7.
67. Arcelli D, Farina A, Cappuzzello C, Bresin A, De Sanctis P, Perolo A, et al. Identification of circulating placental mRNA in maternal blood of pregnancies affected with fetal congenital heart diseases at the second trimester of pregnancy: implications for early molecular screening. *Prenat Diagn*. 2010;30:229–34.
68. Ng EK, Leung T, Tsui NB, Lau TK, Panesar NS, Chiu RW, et al. The Concentration of Circulating Corticotropin-releasing Hormone mRNA in Maternal Plasma Is Increased in Preeclampsia. *Clin Chem*. 2003;49:727–31.
69. Farina A, Sekizawa A, Purwosunu Y, Rizzo N, Banzola I, Concu M, et al. Quantitative distribution of a panel of circulating mRNA in preeclampsia versus controls. *Prenat Diagn*. 2006;26:1115–20.
70. Shimizu H, Sekizawa A, Purwosunu Y, Nakamura M, Farina A, Rizzo N, et al. PP13 mRNA expression in the cellular component of maternal blood as a marker for preeclampsia. *Prenat Diagn*. 2009;29:1231–6.
71. Purwosunu Y, Sekizawa A, Koide K, Farina A, Wibowo N, Wiknjosastro GH, et al. Cell-free mRNA concentrations of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator are increased in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Clin Chem*. 2007;53:399–404.
72. Purwosunu Y, Sekizawa A, Okazaki S, Farina A, Wibowo N, Nakamura M, et al. Prediction of preeclampsia by analysis of cell-free messenger RNA in maternal plasma. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;200, 386.e381–7.
73. Pang WW, Tsui MH, Sahota D, Leung TY, Lau TK, Lo YM, et al. A strategy for identifying circulating placental RNA markers for fetal growth assessment. *Prenat Diagn*. 2009;29:495–504.
74. Masuzaki H, Miura K, Yoshiura K, Yamasaki K, Miura S, Yoshimura S, et al. Placental mRNA in maternal plasma and its clinical application to the evaluation of placental status in a pregnant woman with placenta previa-percreta. *Clin Chem*. 2005;51:923–5.