



REVISIÓN

Situación actual del diagnóstico prenatal no invasivo

Alejandra Fernández Fernández^a, Belén Prieto García^b y
Francisco V. Álvarez Menéndez^{b,c,*}

^aLaboratorio de Bioquímica, Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Alvarez Buylla, Mieres, Asturias, España

^bServicio de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Asturias, España

^cDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo, Asturias, España

Recibido el 1 de septiembre de 2008; aceptado el 20 de noviembre de 2008

PALABRAS CLAVE

ADN fetal;
Células fetales;
Eritroblastos;
Diagnóstico prenatal
no invasivo

Resumen

El diagnóstico prenatal se basa en la obtención de tejido fetal, mediante métodos invasivos, para su posterior análisis genético. La amniocentesis y la biopsia corial son las técnicas más utilizadas, cuyo principal inconveniente es que conllevan un riesgo de aborto, entre el 0,5–1% y el 3,9%, respectivamente. El aislamiento de células fetales en sangre materna permite obtener material genético del feto de forma no invasiva, pero su escasez en sangre materna dificulta su utilización como método diagnóstico. La relativa abundancia del ADN fetal en la circulación materna, junto con la sensibilidad de la técnica utilizada para su cuantificación, convierten la detección de ADN fetal en plasma materno en un método alternativo para el diagnóstico de las enfermedades ligadas al cromosoma X o la determinación del estado RhD.

En este artículo se hace una revisión del estado actual de los métodos de diagnóstico prenatal no invasivo.

© 2008 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Fetal DNA;
Fetal cells;
Eritroblasts;
Non-invasive prenatal
diagnosis

Current state of the non-invasive prenatal diagnosis methods

Abstract

Prenatal diagnosis is based on genetic analysis of invasively obtained fetal tissue. Amniocentesis and chorial biopsy are the most used techniques, but carry a potential risk of miscarriage, from 0.5–1% up to 3.9% respectively. Isolation of fetal cells from maternal blood allows a non-invasive obtention of fetal genetic material, but their scarcity difficult an efficient diagnosis method. The relative abundance of fetal DNA in maternal blood, as well as the sensitivity of quantitative PCR based methods, constitute an attractive

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fvarezmen@gmail.com (F.V. Álvarez Menéndez).

alternative method for X-linked diseases and RhD status diagnosis.

In this paper, a review of the present state of non-invasive prenatal diagnosis methods is described.

© 2008 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El diagnóstico prenatal reúne un conjunto de estrategias para la identificación de defectos congénitos durante el embarazo, como alteraciones morfológicas, estructurales, funcionales o moleculares del feto.

El desarrollo de la amniocentesis a finales de los años sesenta del siglo pasado, y la biopsia corial en los años ochenta, permitió obtener tejido fetal durante el embarazo, y posibilitó el diagnóstico prenatal de defectos congénitos. Sin embargo, estas técnicas invasivas conllevan riesgos para el feto y la madre, por lo que no se ofrecen a todas las gestantes. En las últimas décadas se han desarrollado métodos de cribado que, aunque no aportan un diagnóstico definitivo, seleccionan embarazos de riesgo a edades gestacionales tempranas y permiten racionalizar el uso de los procedimientos invasivos. En la actualidad, el cribado prenatal de cromosopatías incorpora marcadores bioquímicos y ecográficos, además de la edad materna y otros factores de riesgo de la gestante, e incrementan considerablemente la tasa de detección. No obstante, lo ideal sería desarrollar métodos no invasivos para obtener tejido fetal, porque permitirían generalizar el diagnóstico de cromosopatías a todas las gestantes, así como minimizar el número de pruebas que comportan riesgo para el feto. Tras el descubrimiento de la presencia de células fetales y ADN fetal en la circulación materna, se ha investigado su posible utilidad para el diagnóstico prenatal no invasivo¹⁻³.

En esta revisión se expone la evolución y la situación actual de los métodos no invasivos de obtención de tejido fetal aplicados al diagnóstico prenatal.

Células fetales

Descubrimiento de células fetales en sangre materna

En 1893, el patólogo alemán Schmorl⁴ describió por primera vez la presencia de células trofoblásticas en los pulmones y en la circulación sanguínea de gestantes muertas por eclampsia, hallazgo que no fue confirmado hasta 1959 por Douglas et al⁵. El aislamiento de trofoblastos en sangre periférica materna se publicó 25 años después⁶. Estas células alcanzan la circulación materna en las primeras semanas de gestación, desaparecen entre las semanas 10 y 12, y presentan una morfología multinuclear característica que facilita su identificación pero dificulta el análisis del material genético por hibridación in situ fluorescente (FISH). Por otra parte, dado su origen placentario, no reflejan el cariotipo real del feto en el 1% de los casos en que existe un mosaicismo⁷, a lo que se añade la dificultad para desarrollar anticuerpos monoclonales específicos para estas células⁸.

En 1969, Walknowska et al⁹ aislaron linfocitos fetales en sangre de mujeres portadoras de fetos varones, primera evidencia de la presencia de estas células fetales en sangre periférica materna. En los años setenta del siglo pasado, se confirmó este hallazgo, pero la detección de cromatina Y en gestantes portadoras de fetos femeninos originó la falta de consenso sobre la utilidad de los métodos citogenéticos para este fin. La citometría de flujo permitió aislar linfocitos fetales en sangre materna basándose en las diferencias existentes entre antígenos leucocitarios humanos (HLA) de la madre y el feto¹⁰, sin alcanzar el 100% de sensibilidad y especificidad. Se postuló que la pérdida de especificidad podía deberse al aislamiento de células fetales de un embarazo anterior o de un aborto espontáneo. En 1996, Bianchi et al¹¹ observaron linfocitos fetales de varón en sangre materna varios años después del parto, lo que representa un gran inconveniente para la utilización de este tipo celular como base para el diagnóstico prenatal. Otra limitación importante es la necesidad de disponer de anticuerpos anti-HLA específicos para cada individuo, lo que requiere no sólo el estudio del HLA paterno sino también que haya diferencias en el HLA de la pareja.

En 1990, Bianchi et al¹² aislaron eritroblastos fetales en sangre materna mediante anticuerpos monoclonales que reconocían el receptor de la transferrina (CD71). A partir de este momento, muchos grupos de trabajo se centraron en el estudio de estas células como fuente de tejido fetal.

El eritroblasto: célula diana ideal para el diagnóstico prenatal

El eritroblasto posee características que lo convierten en el candidato ideal para el diagnóstico prenatal no invasivo. En primer lugar, su identificación morfológica es sencilla y, al ser una célula nucleada, contiene toda la información genética del feto. Por otra parte, su corta vida media (25–35 días) y su limitada capacidad proliferativa hacen poco probable el aislamiento de eritroblastos fetales de embarazos previos. Además, posee diversos marcadores celulares que facilitan su aislamiento e identificación. Por último, los eritroblastos forman una fracción importante de las células de la serie roja en la sangre fetal, con un valor máximo a las 8 semanas¹³, aunque son poco abundantes en la sangre periférica adulta.

El paso de eritroblastos fetales a la circulación materna se produce a partir de la sexta semana de gestación. Una cuestión muy debatida ha sido la edad gestacional óptima para su aislamiento. Se ha descrito un aumento del número de eritroblastos fetales en el segundo trimestre de gestación¹⁴, así como su porcentaje al pasar del segundo al tercer trimestre de gestación¹⁵. Otros autores, en cambio, han observado un descenso¹⁶. Recientemente, Hyoda et al¹⁷ han descrito la presencia de eritroblastos fetales en sangre

materna hasta el momento del parto, así como su rápida desaparición después del nacimiento. La apoptosis sería la principal causa de la eliminación de las células fetales tras el parto; su persistencia en la sangre materna, una vez concluido el embarazo, se ha atribuido a progenitores resistentes a la apoptosis o a una regulación deficiente de ésta¹⁸.

Otro punto controvertido es el porcentaje de eritroblastos fetales en sangre materna. Aunque normalmente no se detectan eritroblastos en sangre periférica de adultos sanos, su presencia durante el embarazo es un hecho constatado. Se ha descrito que entre un 74 y un 85% de los eritroblastos aislados en sangre materna son de origen fetal^{19,20}. Sin embargo, la disparidad de resultados entre los diferentes estudios es llamativa, la mayoría de los cuales describen porcentajes mucho más bajos, de un 50²¹, un 20%²² o incluso inferiores al 5%^{23,24}. No hay, pues, consenso sobre la proporción de eritroblastos fetales en sangre materna, aunque algunos autores estiman que es del orden de 1 célula/ml de sangre materna²⁵.

Aislamiento de eritroblastos fetales en sangre materna

En condiciones normales, la placenta establece una barrera fetomaterna, de forma que se transfiere un número reducido de células fetales a la circulación materna. La baja proporción de eritroblastos fetales en sangre materna hace necesarios métodos de enriquecimiento y purificación como etapas previas al análisis genético.

- **Enriquecimiento celular.** El método más utilizado es la centrifugación en gradiente de densidad discontinuo²⁶, ya sea simple (1077 g/l²⁷ o 1119 g/l²⁸), doble (1077/1119 g/l²⁹) o triple³⁰. Proporciona un buen rendimiento pero una pureza baja, ya que se aísla un elevado número de células mononucleadas de la serie blanca. Además, la distribución de los eritroblastos en el gradiente de densidad está afectada por el tiempo transcurrido entre la recogida de la muestra y su procesamiento³¹. Otra opción es la lisis selectiva de las células de la serie roja con cloruro de amonio³². Los eritroblastos fetales son menos susceptibles a la lisis que los eritrocitos adultos, lo que permite eliminar un gran número de células maternas contaminantes. No obstante, durante la lisis celular los eritroblastos fetales presentan alteraciones de membrana que dificultan su posterior análisis³³.
- **Purificación celular.** Para la purificación de eritroblastos se han utilizado técnicas, como la separación celular mediante citometría de flujo (FACS)^{10,12}, la separación celular activada magnéticamente (MACS)^{23,34}, la manipulación de células individuales³⁵, la separación por flujo de carga (CFS)³⁶, el aislamiento con partículas inmunomagnéticas³⁷, la suspensión líquida de micropartículas de hierro con separación magnética³⁸ o la separación en columnas con avidina³⁹.

Los métodos más utilizados (FACS y MACS) se basan en las diferencias antigénicas entre las células de interés y las

células contaminantes. Hasta el momento no se han descubierto antígenos de superficie específicos de eritroblastos fetales, por lo que el uso de anticuerpos anti-CD71 (comerciales⁴⁰ o no comerciales^{31,41,42}) ha sido la alternativa más frecuente.

Para aumentar la especificidad del método, se propuso la combinación con otros anticuerpos, como la glicoforina A (GPA), una sialoproteína que se expresa en todas las células de la serie roja. Sin embargo, el anticuerpo anti-GPA produce aglutinación de los eritrocitos, dificultando el análisis de los eritroblastos aislados⁴³.

Otros anticuerpos utilizados son el anti-CD36, que reconoce el receptor de la trombospodina²⁵, o los anti-CD45 y anti-CD32, que permiten el marcaje de las células contaminantes para su posterior eliminación^{29,37}.

Por otra parte, se ha propuesto el marcaje de la cadena gamma de la hemoglobina fetal o la cadena épsilon de la hemoglobina embrionaria⁴⁴. Sin embargo, durante el embarazo se estimula la síntesis de una pequeña cantidad de hemoglobina fetal en las células maternas, reduciendo la especificidad del método y limitando su aplicación. De Graaf et al³² describieron el origen materno del 20% de los eritroblastos que expresan hemoglobina fetal. La hemoglobina embrionaria sólo se expresa en los eritroblastos fetales pero no se detecta a partir de la semana 14 de gestación⁴⁵.

Por último, se ha descrito la utilización de una lectina que se une específicamente a los residuos de galactosa presentes en la superficie celular del eritroblasto⁴⁶.

- **Análisis genético.** Los métodos más utilizados para determinar el origen fetal de los eritroblastos aislados han sido la FISH y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Dada su sensibilidad y su especificidad elevadas, la PCR permite detectar secuencias específicas del cromosoma Y⁴⁷, y demostrar así el origen fetal de la célula si el feto es varón. El análisis genético por PCR puede aplicarse a células individuales seleccionadas mediante microdissección⁴⁸. Esta estrategia es eficaz pero requiere experiencia del operador, es laboriosa y conlleva pérdidas celulares hasta de un 18%.

La FISH con sondas específicas para los cromosomas X, Y, 21, 13 y 18 permite determinar el origen fetal de los eritroblastos aislados (en caso de feto varón) e identificar las aneuploidías más frecuentes^{49,50}. Krabchi et al⁵¹ describieron la identificación y la cuantificación de células fetales en sangre materna de gestantes portadoras de un feto con síndrome de Down, mediante marcaje in situ cebado (*primed in situ labelling* [PRINS]), técnica que utiliza un oligonucleótido cebador que se fija al ADN cromosómico.

El cultivo selectivo de células precursoras eritroides en sangre materna podría incrementar el número de células fetales disponibles⁵² y permitir el análisis de las células en metafase para la detección de anomalías cromosómicas⁵³. Sin embargo, estos resultados no fueron reproducidos por otros investigadores^{54,55}.

En los últimos años, se han descrito métodos para el reconocimiento de los eritroblastos fetales basados en su morfología característica (núcleo compacto, condensación asimétrica de la cromatina y patrón de tinción característico con la cadena gamma de la hemoglobina fetal)⁵⁶. La

automatización de este método (análisis microscópico y tratamiento de imágenes) permitiría el análisis de un gran número de células, y facilitar la identificación de los eritroblastos fetales en sangre materna sin necesidad de enriquecimiento celular.

Eritroblastos fetales y diagnóstico prenatal

El aislamiento de eritroblastos fetales en sangre materna ha demostrado potencial utilidad para la detección de aneuploidías^{20,49,57,58}, el estudio del estado RhD fetal⁵⁹, el diagnóstico de enfermedades genéticas mendelianas como la distrofia muscular de Duchenne⁶⁰, el diagnóstico de hemoglobinopatías⁶¹ o la detección de complicaciones obstétricas^{62,63}.

En 1997, Bianchi et al⁴⁷ demostraron que el número de eritroblastos en sangre materna es superior en gestantes con fetos con síndrome de Down. Falcidia et al⁶⁴ describieron un recuento de eritroblastos 6 veces superior en gestantes con fetos con trisomía 21. Este fenómeno no se observa en otras anomalías cromosómicas, como las trisomías 13 y 18. En Estados Unidos, el estudio NIFTY (National Institutes of Health Fetal Cell Study) valoró la eficacia del aislamiento de células fetales en sangre materna, y describió una sensibilidad del 41% para la detección del sexo fetal y del 74%, para el diagnóstico de aneuploidías fetales⁶⁵. Este estudio evidenció que el sistema MACS proporciona mejor recuperación y mayor detección de células fetales que FACS.

El número de eritroblastos también aumenta en sangre materna en casos de crecimiento intrauterino retardado o polihidramnios. Este aumento podría estar asociado a alteraciones estructurales de la placenta^{66,67}.

La hipertensión gestacional es una de las complicaciones obstétricas más frecuentes. Aproximadamente, el 20% de las pacientes con hipertensión gestacional presentan criterios de preeclampsia, una de las principales causas de morbi-mortalidad materna y fetal. En 1994, Ganshirt et al⁶⁸ describieron un aumento del número de eritroblastos en 43 gestantes con preeclampsia respecto a un grupo control formado por 222 embarazadas sin complicaciones obstétricas. Este hallazgo se confirmó en gestantes portadoras de fetos varones, lo que afirma que una gran proporción de los eritroblastos aislados eran de origen fetal⁶⁹. Aunque se desconoce la etiología de la enfermedad, parece que los mecanismos responsables de la patogenia se producen en una fase temprana del embarazo, probablemente durante la implantación^{70,71}, y se ha descrito un aumento del número de eritroblastos en gestantes con un Doppler uterino alterado, a partir de la semana 20 de gestación, e incluso antes de que la enfermedad se manifieste clínicamente⁷². Álvarez et al⁷³ observaron un aumento del número de eritroblastos en gestantes que posteriormente desarrollaron preeclampsia, si bien los eritroblastos aislados eran mayoritariamente de origen materno y no fetal.

Las investigaciones llevadas a cabo hasta ahora manifiestan la escasez de células fetales en sangre materna, por lo que se requieren métodos de enriquecimiento laboriosos, y la ausencia de marcadores específicos para su identificación. Actualmente, no se dispone, en la práctica clínica, de un método de cribado o de diagnóstico prenatal no invasivo

basado en el aislamiento de eritroblastos fetales en sangre materna.

ADN/ARN fetal

Descubrimiento de ADN fetal libre en la circulación materna

En 1997, Lo et al³ demostraron la presencia de ADN fetal en la circulación materna mediante la detección de secuencias del cromosoma Y en plasma materno. La PCR a tiempo real permitió la cuantificación de secuencias de ADN fetal con una sensibilidad y una especificidad próximas al 100%, y reveló que la concentración de ADN en plasma materno es mucho más alta de lo que cabría esperar si todo el ADN fetal detectado procediese de la fracción celular fetal existente en la circulación materna.

Se ha detectado ADN fetal en plasma materno a partir de la quinta semana de gestación⁷⁴. La concentración de ADN total parece aumentar significativamente durante el embarazo^{75,76}, aproximadamente un 29,3% en cada semana de gestación⁷⁷, pero el ADN fetal supone tan sólo un 5–7% del total⁷⁸. Tras el parto, el ADN fetal desaparece de la circulación materna en cuestión de minutos⁷⁹. Botezatu et al⁷⁵ proponen como posible mecanismo el aclaramiento renal del ADN fetal, dado que se ha detectado en orina de mujeres embarazadas portadoras de un feto varón.

Actualmente, se conoce poco sobre las características biológicas y moleculares del ADN fetal presente en la circulación materna. Un descubrimiento interesante es que el tamaño del ADN fetal es más pequeño que el materno, lo que podría utilizarse como un posible método de enriquecimiento del ADN fetal⁷⁷.

Origen del ADN fetal libre en la circulación materna

La degradación de las células fetales intactas presentes en la circulación materna es uno de los posibles mecanismos de liberación de ADN fetal a la circulación materna. Un elevado número de células fetales presentan apoptosis, por interacción con el sistema inmunitario materno⁸⁰, lo que explicaría el aumento del número de eritroblastos y de la cantidad de ADN fetal en gestantes con preeclampsia o con fetos con aneuploidías. Sin embargo, dado el bajo porcentaje de eritroblastos fetales en sangre materna, estas células difícilmente pueden ser el único origen del ADN fetal en plasma materno. La correlación entre la concentración de ADN fetal en plasma materno tanto con la edad gestacional como con la concentración de hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), así como la detección de secuencias de ADN fetal días después de la implantación y la elevación de las concentraciones de dicho ADN fetal en gestantes con preeclampsia, sugieren un origen placentario del ADN fetal en plasma materno, probablemente también por apoptosis de las células trofoblásticas. Por otra parte, la detección de secuencias de ADN fetal en otros fluidos como el líquido amniótico⁸¹, la orina materna y líquidos cefalorraquídeo y peritoneal maternos^{82,83} ha llevado a considerar la posibilidad de una transferencia directa de ADN. Es muy probable que los 3 mecanismos coexistan y que la placenta aporte la mayor parte del ADN fetal libre en plasma.

Análisis de ADN fetal en plasma materno

Hay diferencias importantes entre los métodos descritos para el análisis del ADN en plasma materno lo que explica la falta de homogeneidad en los resultados publicados. En 2004, se describió un protocolo para la comparación de la detección de ADN fetal entre diferentes laboratorios⁸⁴. Las sensibilidades variaban entre el 31,4 y el 97,1% para la detección de secuencias de ADN del gen *SRY* con especificidades del 92,8–100%. En dicho estudio se consideraron parámetros críticos para la calidad de los resultados el retraso en el procesamiento de las muestras y la eficacia del proceso de extracción de ADN. El tratamiento inadecuado de las muestras puede conducir a la lisis de células residuales de origen materno en el plasma, que interfieren en la cuantificación de las secuencias de ADN fetal.

ADN fetal y diagnóstico prenatal

En general, las aplicaciones clínicas de la detección de ADN fetal en el plasma materno se basan en la cuantificación de secuencias de ADN fetal o en la detección de secuencias exclusivas del feto. Muchas de las complicaciones del embarazo se asocian a un aumento de la cantidad de ADN fetal en la circulación materna. La principal limitación es la necesidad de marcadores fetales independientes del sexo, como polimorfismos de ADN⁸⁵, marcadores epigenéticos fetales⁸⁶ o ARNm de genes expresados en la placenta⁸⁷. Sin embargo, la determinación no invasiva de enfermedades mendelianas, como la talasemia o la fibrosis quística, parece cada vez más cercana⁸⁸.

La primera aplicación del análisis de ADN fetal en plasma materno fue la detección del sexo fetal, de utilidad para el diagnóstico de enfermedades ligadas al cromosoma X^{3,89,90}. La detección de secuencias específicas del cromosoma Y se ha utilizado también para estudiar la posible relación entre la concentración de ADN fetal y la presencia de complicaciones asociadas al embarazo o de trisomías fetales. Se ha descrito un aumento de la concentración de ADN fetal en plasma materno en casos de trisomía 21⁹¹, hiperemesis gravídica⁹², placenta invasiva⁹³ o preeclampsia⁹⁴, donde el aumento de la concentración de ADN fetal parece producirse incluso antes de la manifestación clínica de la enfermedad y se correlaciona con la gravedad⁹⁵. La determinación del sexo fetal en las primeras semanas de gestación también es útil en los embarazos con riesgo de hiperplasia adrenal congénita⁹⁶, puesto que permite iniciar una terapia con dexametasona que evita la virilización de los genitales externos femeninos.

El marcador más utilizado para la cuantificación de ADN de varón en plasma materno ha sido el gen *SRY*. En el primer trimestre de gestación, la concentración de ADN fetal en sangre materna es cercana al límite de detección de la técnica, por lo que se pueden observar falsos negativos. Sin embargo, la amplificación de secuencia multicopia del gen *DYS14* ha permitido obtener límites de detección 10 veces inferiores a los descritos con secuencias del gen *SRY*⁹⁷.

La cuantificación de ADN fetal en plasma materno se ha propuesto como método de diagnóstico prenatal en los casos de aneuploidía. No obstante, el ADN fetal representa menos del 10% del ADN circulante en plasma materno, lo que

dificulta la detección de *loci* fetales o polimorfismos. Recientemente, se han desarrollado métodos para la detección de aneuploidías basados en la variación alélica entre la madre y el feto. Estos métodos determinan la dosis cromosómica fetal mediante el análisis de ratios alélicas de variantes genéticas, si el feto es heterocigoto para el *locus* detectado⁹⁸. La primera demostración empleando marcadores de metilación de ADN utilizó las secuencias hipometiladas de *SERPINB5*, localizadas en el cromosoma 18, como dianas específicas del feto⁹⁹. La determinación de la ratio alélica de un polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el promotor hipometilado de *SERPINB5* en fetos heterocigotos se conoce como ratio alélica epigenética. Con el reconocimiento de marcadores de metilación de ADN en el cromosoma 21¹⁰⁰, esta alternativa podría aplicarse para la detección prenatal no invasiva de la trisomía 21. Dhallan et al¹⁰¹ han utilizado alelos específicos fetales para la detección de esta trisomía. Sin embargo, estos métodos sólo se pueden aplicar a ciertas poblaciones, ya que dependen de la presencia de polimorfismos genéticos en *loci* específicos. Algunos investigadores proponen la utilización de métodos universales que permitan la cuantificación digital de ADN fetal.^{102,103} Fan et al¹⁰⁴ han desarrollado un método para la cuantificación digital de ADN basado en una secuenciación y mapeo del cromosoma de origen y en la enumeración de los fragmentos por cromosoma, para el diagnóstico de las trisomías 21, 13 y 18.

Otras aplicaciones de la detección de ADN fetal en la circulación materna son la determinación del estado RhD fetal¹⁰⁵, el diagnóstico de la acondroplasia¹⁰⁶, la distrofia miotónica¹⁰⁷, la betatalasemia¹⁰⁸ o la enfermedad de Huntington¹⁰⁹. De todas ellas, la más extendida en la actualidad es el diagnóstico no invasivo del RhD fetal en gestantes con riesgo de enfermedad hemolítica del recién nacido. Esto permite seleccionar embarazos que requieren una monitorización más exhaustiva, además de racionalizar la administración de la terapia anti-D, lo que requiere que el diagnóstico se realice precozmente¹¹⁰. Estudios recientes han obtenido una sensibilidad del 99%, con una especificidad del 99,9% para la detección de fetos D-positivos en la semana 28 de gestación, lo que significa que el diagnóstico del Rh fetal a gran escala ya es viable^{111,112}.

ARN fetal en plasma materno

En el año 2000 se demostró la presencia de ARN fetal en plasma materno en gestantes con un feto varón¹¹³. Este hecho supuso el punto de partida para la detección de ácidos nucleicos en plasma materno con independencia del sexo fetal y de la existencia de polimorfismos genéticos. En la búsqueda de un marcador fetal independiente del sexo, Ng et al¹¹⁴ desarrollaron un método para la cuantificación de ARN en plasma que pone en evidencia la inesperada estabilidad del ARN circulante y demuestra que la placenta es una fuente importante del ARN fetal presente en la circulación materna. La detección de secuencias de ARNm específicas de la placenta supone una alternativa a la cuantificación de ADN fetal para el diagnóstico de aneuploidías. Este método presenta la ventaja de que estas secuencias no se expresan en los tejidos maternos, por lo que son específicas del feto. Lo et al¹¹⁵ han desarrollado un

método para la detección de secuencias de ARNm del gen *PLAC4*, localizado en el cromosoma 21 para la detección de esta aneuploidía.

Conclusiones y perspectivas de futuro

Tras muchos años de investigación, el aislamiento de células fetales en sangre materna prácticamente se ha descartado debido a su escasez, aceptada como un fenómeno biológico, que no se ha solventado eficazmente con los métodos disponibles. Se necesitan 2 cambios en el estado actual para establecer un diagnóstico prenatal basado en la obtención no invasiva de células fetales: un enriquecimiento eficaz de eritroblastos en el primer trimestre de gestación y marcadores fetales específicos. El análisis puede ser optimizado por la detección automatizada al microscopio¹¹⁶. No obstante, estos métodos no parecen los más apropiados para procesar un gran número de muestras.

El análisis del ADN y ARN fetal es una alternativa más realista en el futuro del diagnóstico prenatal no invasivo¹¹⁷. La relativa abundancia del ADN fetal en plasma materno facilita su detección. La principal limitación es que actualmente sólo es posible detectar secuencias que difieran del ADN genómico materno. Serán necesarios marcadores independientes del sexo, como la detección de secuencias de ARNm.

Aunque aún de manera limitada, en la práctica clínica ya se está aplicando el aislamiento de ADN en sangre materna para el diagnóstico del sexo fetal, en parejas con riesgo de enfermedades genéticas ligadas al cromosoma X, y del Rh fetal en embarazos con riesgo de enfermedad hemolítica del recién nacido.

La exploración de nuevas proteínas y transcritos placentarios probablemente ofrezcan en un futuro nuevas oportunidades como marcadores diagnósticos de cromosomopatías. Cabe esperar que surjan alternativas en el campo de la posgenómica con suficiente eficacia como para sustituir los métodos actuales de cribado de cromosomopatías por un diagnóstico prenatal en sangre materna sin ningún riesgo para el feto.

Financiación

Los autores agradecen a la Obra Social y Cultural Cajastur la financiación parcial de su proyecto de investigación.

Bibliografía

- Lo YMD. Non-invasive prenatal diagnosis using fetal cells in maternal blood. *J Clin Pathol*. 1994;47:1060-5.
- Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol*. 1999;105:574-83.
- Lo YMD, 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.
- Schmorl G. Pathologisch-anatomische Untersuchungen über Plöbleraleklampsie. Leipzig: Vogel; 1893.
- Douglas GWL, Thomas M, Carr NM, Cullen NM, Morris R. Trophoblasts in the circulating blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1959;58:960-73.
- Covone AE, Johnson PM, Mutton D, Adinolfi M. Trophoblast cells in peripheral blood from pregnant women. *Lancet*. 1984;2:841-3.
- Hahnemann JM, Vejerslev LO. Accuracy of cytogenetic findings on chorionic villus sampling (CVS)-diagnostic consequences of CVS mosaicism and non-mosaic discrepancy in centres contributing to EUCROMIC 1986-1992. *Prenat Diagn*. 1997;17:801-20.
- Tjoa ML, Delli-Bevi L, Johnson KL, Bianchi DW. Antibodies to trophoblast antigens HLA-G, placenta growth factor, and neuroD2 do not improve detection of circulating trophoblast cells in maternal blood. *Fetal Diagn Ther*. 2007;22:85-9.
- Walknowska J, Conte FA, Whiteacre FE. Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer. *Lancet*. 1969;1:1119-22.
- Herzenberg LA, Bianchi DW, Schroder J, Cann HM, Iverson GM. Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76:1453-5.
- Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:705-8.
- Bianchi DW, Flint AF, Pizzimonte MF, Knoll JHM, Latt SS. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:3279-83.
- Thomas DB, Yoffey JM. Human fetal haematopoiesis: the cellular composition of fetal blood. *Br J Haematol*. 1962;8:290-5.
- Bischoff FZ, Sinacori MK, Dang DD, Marquez-Do D, Horne C, Lewis DE, et al. Cell-free fetal DNA and intact fetal cells in maternal blood circulation: implications for first and second trimester non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update*. 2002;8:493-500.
- Hamada H, Arinami T, Kubo T, Hamaguchi H, Iwasaki H. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Hum Genet*. 1993;91:427-32.
- Al-Mufti R, Hambley H, Farzaneh F, Nicolaidis KH. Fetal erythroblast in maternal blood in relation to gestational age. *J Matern Fetal Neonat Med*. 2003;14:392-7.
- Hyoda M, Samura O, Fujito N, Tanigawa M, Miyoshi H, Fujiwara H, et al. No correlation between the number of fetal nucleated cells and the amount of cell-free fetal DNA in maternal circulation either before or after delivery. *Prenat Diagn*. 2007;27:717-21.
- Kolialexi A, Tsangaris GT, Anagnostopoulos A, Chondros D, Bagiokos V, Kitsiou S, et al. Two-way trafficking of Annexin V positive cells between mother and fetus: determination of apoptosis at delivery. *Prenat Diagn*. 2007;27:348-51.
- Takabayashi H, Kuwabara S, Ukita T, Ikawa K, Yamafuji K, Igarashi T. Development of non-invasive fetal DNA diagnosis from maternal blood. *Prenat Diagn*. 1995;15:74-7.
- Elias S, Price J, Dockter M, Wachtel SS, Tharapel A, Simpson JL, et al. First trimester diagnosis of trisomy 21 in fetal cells from maternal blood [carta]. *Lancet*. 1992;340:1033.
- Troeger C, Zhong XY, Burgemeister R, Minderer S, Tercanli S, Holzgreve W, et al. Approximately half of the erythroblasts in maternal blood are of fetal origin. *Mol Hum Reprod*. 1999;5:1162-5.
- Slunga-Talberg A, El-Rifai W, Keinänen M, Kurki T, Klinger K, Ylikorkala O, et al. Maternal origin of nucleated erythrocytes in peripheral venous blood of pregnant women. *Hum Genet*. 1995;96:53-7.
- Büsch J, Huber P, Pflüger E, Milteny ST, Holtz J, Radbruch A. Enrichment of fetal cells from maternal blood by high gradient magnetic cell sorting (doubling MACS) for PCR-based genetic analysis. *Prenat Diagn*. 1994;14:1129-40.

24. Prieto B, Cándenas M, Venta R, Ladenson JH, Álvarez FV. Isolation of fetal nucleated red blood cells in normal and aneuploid pregnancies. *Clin Chem Lab Med.* 2002;40:667-72.
25. Gänshirt-Ahlert D, Pohlschmidt M, Gal A, Miny P, Horst J, Holzgreve W. Ratio of fetal to maternal DNA is less than 1 in 5000 at different gestational ages in maternal blood. *Clin Genet.* 1990;38:38-43.
26. Bhat NM, Bieber NM, Teng NNH. One step separation of human fetal lymphocytes from nucleated red blood cells. *J Immunol Methods.* 1990;131:147-52.
27. Gänshirt-Ahlert D, Burschik M, Garritsen HSP, Helmer L, Miny P, Horst J, et al. Magnetic cell sorting and the transferrin receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;166:1350-5.
28. Sekizawa A, Farina A, Zhen DK, Wang JY, Falco VM, Elmes S, et al. Improvement of fetal cell recovery from maternal blood: Suitable density gradient for FACS separation. *Fetal Diagn Ther.* 1999;14:229-33.
29. Wang JY, Zhen DK, Falco VM, Farina A, Zheng YL, Delli-Bovi LC, et al. Fetal nucleated erythrocyte recovery: fluorescence activated cell sorting positive selection using anti-gamma globin versus magnetic activated cell sorting using anti-CD45 depletion and anti-gamma globin positive selection. *Cytometry.* 2000;39:224-30.
30. Oosterwijk JC, Mesker WE, Ouwerkerk CM, Kneplé CFHM, Wiesmeijer KC, Beverstock GC, et al. Fetal cell detection in maternal blood: a study in 236 samples using erythroblast morphology, DAB and HbF staining, and FISH analysis. *Cytometry.* 1998;32:178-85.
31. Prieto B, Alonso R, Paz A, Cándenas M, Venta R, Ladenson JH, et al. Optimization of nucleated red blood cell (NRBC) recovery from maternal blood collected using both layers of a double density gradient. *Prenat Diagn.* 2001;21:187-93.
32. De Graaf IM, Jakobs ME, Leschot NJ, Ravkin I, Goldbard S, Hoovers JM. Enrichment, identification and analysis of fetal cells from maternal blood: evaluation of a prenatal diagnosis system. *Prenat Diagn.* 1999;19:648-52.
33. Choolani M, O'Donoghue K, Talbert D, Kumar S, Roberts I, Letsky E, et al. Characterization of first trimester fetal erythroblasts for non-invasive prenatal diagnosis. *Mol Hum Reprod.* 2003;9:227-35.
34. Milteny S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry.* 1990;11:231-8.
35. Sekizawa A, Taguchi A, Watanabe A, Kimura T, Saito H, Yanahaira T, et al. Analysis of HLA-DQ alpha sequences for prenatal diagnosis in single fetal cells from maternal blood. *Hum Genet.* 1998;102:393-6.
36. Wachtel SS, Sammons D, Manley M, Watchel G, Twitty G, Utermohlen, et al. Fetal cells in maternal blood: recovery by charge flow separation. *Hum Genet.* 1996;98:162-6.
37. Bianchi DW, Klinger KW, Vadnais TJ, DeMaria MA, Shuber AP, Skoletsky J, et al. Development of a model system to compare cell separation methods for the isolation of fetal cells from maternal blood. *Prenat Diagn.* 1996;16:289-98.
38. Martin B, Bruce J, Smith N, Liu D, Durrant L. A magnetic colloid system for isolation of rare cells from blood for FISH analysis. *Prenat Diagn.* 1997;17:1059-66.
39. Hall JM, Adams S, Williams S, Rhese MA, Layton TJ, Molesch DA. Purification of fetal cells from maternal blood using an avidin-biotin immunoaffinity column. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;731:115-27.
40. Wachtel SS, Elias S, Price J, Wachtel G, Phillips O, Shulman L, et al. Fetal cells in maternal circulation: isolation by multi-parameter flow cytometry and confirmation by PCR. *Hum Reprod.* 1991;6:1466-9.
41. Álvarez FV, Olander J, Crimmins D, Prieto B, Paz A, Ladenson JH, et al. Development, characterization and use of monoclonal antibodies made to antigens expressed on the surface of fetal nucleated red blood cells. *Clin Chem.* 1999;45:1614-20.
42. Prieto B, Cándenas M, Ladenson JH, Álvarez FV. Comparison of different CD71 monoclonal antibodies for enrichment of fetal cells from maternal blood. *Clin Chem Lab Med.* 2002;40:126-31.
43. Simpson JL, Lewis DE, Bischoff FZ, Elias S. Isolating fetal nucleated red blood cells from maternal blood: The Baylor experience-1995. *Prenat Diagn.* 1995;15:907-12.
44. Park VM, Bravo RR, Price JO, Simpson JL, Elias S. A model system using fetal haemoglobin to distinguish fetal cells enriched from maternal blood. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;731:133-5.
45. Zheng YL, Zhen DK, Farina A, Berry SM, Wapner RJ, Williams JM, et al. Fetal cell identifiers: Results of microscope slide-based immunocytochemical studies as a function of gestational age and abnormality. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180:1234-9.
46. Babochkina T, Mergenthaler S, Lapaire O, Kiefer V, Yura H, Koike K, et al. Evaluation of a soybean lectin-based method for the enrichment of erythroblasts. *J Histochem Cytochem.* 2005;53:329-30.
47. Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet.* 1997;61:822-9.
48. Parano E, Falcidia E, Grillo A, Pavone P, Cutuli N, Takabayashi H, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by isolation and analysis of fetal cells from maternal blood. *Am J Med Genet.* 2001;101:262-7.
49. Bianchi DW, Mahr A, Zickwolf GK, Housel TW, Flint A, Klinger KW. Detection of fetal cells with 47, XY,+21 karyotype in maternal peripheral blood. *Hum Genet.* 1992;90:368-70.
50. Zheng DK, Wang JY, Falco VM, Weber W, Delli-Bovi L, Bianchi DW. Poly-FISH: a technique of repeat hybridization that improves cytogenetic analysis of fetal cells in maternal blood. *Prenat Diagn.* 1998;18:1181-3.
51. Krabchi K, Gadjji M, Samassekou O, Grégoire MC, Forest JC, Drovín R. Quantification of fetal nucleated cells in maternal blood of pregnant women with a male trisomy 21 fetus using molecular cytogenetic techniques. *Prenat Diagn.* 2006;26:28-34.
52. Lo YMD, Morey AL, Wainscoat JS, Fleming KA. Culture of fetal erythroid cells from maternal peripheral blood. *Lancet.* 1994;344:264-5.
53. Valerio D, Aiello R, Altieri V, Malato AP, Fortunato A, Canazio A. Culture of fetal erythroid progenitors cells from maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 1996;16:1073-82.
54. Chen H, Griffin DK, Jestice K, Hackett G, Cooper J, Ferfuson-Smith MA. Evaluating the cultured of fetal erythroblasts from maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 1998;18:883-92.
55. Zimmermann B, Holzgreve W, Zhong Y, Hahn S. Inability to clonally expand fetal progenitors from maternal blood. *Fetal Diagn Ther.* 2002;17:97-100.
56. Cha DH, Khosrotehrani K, Bianchi DW, Johnson KL. The utility of an erythroblast scoring system and gender-independent short tandem repeat (STR) analysis for the detection of aneuploid fetal cells in maternal blood. *Prenat Diagn.* 2005;25:586-91.
57. Bischoff FZ, Lewis DE, Nguyen DD, Murrell S, Schober W, Scott J, et al. Prenatal diagnosis with use of fetal cells isolated from maternal blood: five-color fluorescent in situ hybridization analysis on flow-sorted cells for chromosomes X, Y, 13, 18, and 21. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179:203-9.
58. Mavrou A, Kouvidi E, Antsklis A, Souka A, Kitsiou Tzeli S, Kolialexi A. Identification of nucleated red blood cells in maternal circulation: a second step in screening for fetal

- aneuploidies and pregnancy complications. *Prenat Diagn.* 2007;27:150–3.
59. Sekizawa A, Watanabe A, Kimura T, Saito H, Yanaihara T, Sato T. Prenatal diagnosis of fetal RhD blood type using a single fetal nucleated erythrocyte from maternal blood. *Obstet Gynecol.* 1996;81:501–5.
 60. Sekizawa A, Kimura T, Sasaki M, Nakamura S, Kabayashi R, Sato T. Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy using a single fetal nucleated erythrocyte in maternal blood. *Neurology.* 1996;46:1350–3.
 61. D'Souza E, Kulkarni S, Colah RB, Mohanty D. An improved flow cytometric approach for isolation of fetal cells from maternal blood for non invasive prenatal diagnosis of hemoglobinopathies. *Hemoglobin.* 2007;31:39–48.
 62. Holzgreve W, Hahn S. Prenatal diagnosis using fetal cells and free DNA in maternal blood. *Clin Perinatol.* 2001;28:353–65.
 63. Zhong XY, Seiborn A, Sohn C, Holzgreve W, Hahn S. High levels of circulatory erythroblast and cell-free DNA prior to intrauterine fetal death. *Prenat Diagn.* 2006;26:1272–3.
 64. Falcidia E, Parano E, Grillo A, Pavone P, Takabayashi H, Trifiletti RR, et al. Fetal cells in maternal blood: a six-fold increases in women who have undergone amniocentesis and carry a fetus with Down syndrome a multicenter study. *Neuropediatrics.* 2004;35:321–4.
 65. Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Elias S, Holzgreve W, Evans MI, et al. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. *Prenat Diagn.* 2002;22:609–15.
 66. Simchem MJ, Barkai G, Lusky A, Guetta E. Fetal hemoglobin-expressing nucleated red blood cell frequencies in pregnancies with intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn.* 2001;21:31–5.
 67. Al-Mufti R, Lees C, Albaiges G, Hambley H, Nicolaides KH. Fetal cells in maternal blood of pregnancies with severe fetal growth restriction. *Hum Reprod.* 2000;15:218–21.
 68. Ganshirt D, Borjesson-Stoll R, Burschik M, Garritsen HS, Neusser M, Smeets FW, et al. Successful prenatal diagnosis from maternal blood with magnetic-activated cell sorting. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;731:103–14.
 69. Holzgreve W, Ghezzi F, Di Naro E, Ganshirt D, Maymon E, Hahn S. Disturbed fetal-maternal cell traffic in preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 1998;91:669–72.
 70. Roberts JM, Redman CWG. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet.* 1993;341:1447–51.
 71. Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179:1359–75.
 72. Holzgreve W, Li JJ, Steinborn A, Kulz T, Sohn C, Hodel M, et al. Elevation in erythroblast count in maternal blood before the onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184:165–8.
 73. Fernández A, Prieto B, Escudero A, Ladenson JH, Álvarez FV. A monoclonal antibody with potential for aiding non-invasive prenatal diagnosis: utility in screening of pregnant women at risk of preeclampsia. *J Histochem Cytochem.* 2005;53:345–50.
 74. Rijnders RJ, Van der Lijdt RB, Peters ED, Goeree JK, Van der Schoot CE, Ploos Van Amstel JK, et al. Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma DNA. *Prenat Diagn.* 2003;23:1042–4.
 75. Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V, Alechina R, Molyata Y, et al. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in a organism. *Clin Chem.* 2000;46:1078–84.
 76. Illanes S, Denbow ML, Smith RP, Overton TG, Soothill PW, Finning K. Detection of cell-free fetal DNA in maternal urine. *Prenat Diagn.* 2006;26:1216–8.
 77. Chan KCA, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2004;50:88–92.
 78. Lo YM. Fetal DNA in maternal plasma. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;906:141–7.
 79. Lo YM. Recent advances in fetal nucleic acids in maternal plasma. *J Histochem Cytochem.* 2005;53:293–6.
 80. Bischoff FZ, Dang D, Horne C, Márquez-Do D, Brinkley WR, Lewis DE, et al. Fetal DNA in maternal plasma circulated as apoptotic bodies: elucidation of the structural nature of fetal DNA for non-invasive diagnosis. *Am J Hum Genet.* 2003;73(Suppl):189.
 81. Bianchi DW, LeShane ES, Cowan JM. Large amounts of cell-free fetal DNA are present in amniotic fluid. *Clin Chem.* 2001;47:1867–9.
 82. Angert RM, LeShane ES, Yarnell RW, Johnson KL, Bianchi DW. Cell-free fetal DNA in the cerebrospinal fluid of peripartum women. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190:1087–90.
 83. Cioni R, Bussani C, Scarselli B, Mello G, Mecacci F, Scarselli G. Detection of fetal DNA in the peritoneal cavity during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003;107:210–1.
 84. Johnson KL, Dukes KA, Vidaver J, LeShane ES, Ramirez I, Weber WD, et al. Interlaboratory comparison of fetal male DNA detection from common maternal plasma samples by real-time PCR. *Clin Chem.* 2004;50:516–21.
 85. Pertl B, Sekizawa A, Samura O, Orescovic I, Rahaim PT, Bianchi DW. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma By multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum Genet.* 2000;106:45–9.
 86. Poon LL, Leung TN, Lau TK, Chow KCK, Lo YM. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2002;48:35–41.
 87. Ng EKO, Tsui TK, Leung TN, Chiu RWK, Panesar NS, Lit LCW, et al. mRNA or placental origin readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:4748–53.
 88. Hahn S, Chitty LS. Noninvasive prenatal diagnosis: current practice and future perspectives. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2008;20:146–51.
 89. Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PMK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998;62:768–75.
 90. Finning KM, Chitty LS. Non-invasive fetal sex determination: Impact on clinical practice. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2008;13:69–75.
 91. Farina A, LeShane ES, Lambert-Messerlian GM, Canick JA, Lee T, Neveux LM, et al. Evaluation of cell-free fetal DNA as a second-trimester maternal serum marker of Down syndrome pregnancy. *Clin Chem.* 2003;49:239–42.
 92. 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.
 93. 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.
 94. Farina A, Sekizawa A, Iwasaki M, Matsouka R, Ichizuka KS, Okar T. Fetal cell-free DNA (beta-globin gene) distribution in maternal plasma at the second trimester: a new prospective for preeclampsia screening. *Prenat Diagn.* 2004;24:722–6.
 95. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. The levels of circulatory cell free DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia. *Clin Chem.* 2001;47:137–9.
 96. Rijnders RJP, Van der Schoot E, Bossers B, De Vroede MAMJ, Christiaens GCML. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol.* 2001;98:374–8.
 97. Zimmermann B, El Sheikh A, Nicolaides K, Holzgreve W, Hahn S. Optimized real-time quantitative PCR measurement of

- male fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2005;51:1598–604.
98. Lo YMD, Chiu RWK. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis. *Clin Chem.* 2008;54:461–6.
99. Chim SSC, Tong YK, Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Chan LYS, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:14753–8.
100. Chim SSC, Jin S, Lee TYH, Lun FMF, Lee WS, Chan LYS, 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.
101. Dhallan R, Guo X, Emche S, Damewood P, Cronin M, Barry J, et al. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet.* 2007;369:474–81.
102. Fan HC, Quake SR. Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction. *Anal Chem.* 2007;79:7576–9.
103. 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 USA.* 2007;104:13116–21.
104. Fan HC, Blumenfeld YJ, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:16266–71.
105. Turner MJ, Martin CM, O’Leary JJ. Detection of fetal Rhesus D gene in whole blood of women booking for routine antenatal care. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003;108:29–32.
106. Saito H, Sekizawa A, Morindo T, Suzuki M, Yanaihara T. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet.* 2000;356:1170.
107. 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.
108. Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YM. Prenatal exclusion of beta thalassemia major by examination of maternal plasma. *Lancet.* 2002;360:998–1000.
109. González-González MC, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, García-Hoyos M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens, et al. Huntington disease-unaaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn.* 2003;23:232–4.
110. Van der Schoot CE, Hahn S, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis and determination of fetal Rh status. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2008;13:63–8.
111. Van der Schoot CE, Soussan AA, Dee R, Bonsel GJ, De Haas M. Screening for foetal RhD-genotype by plasma PCR in all D negative pregnant women is feasible. *Vox Sang.* 2004; 87(Suppl):9.
112. Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ.* 2008; 336:816–8.
113. Poon LL. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2000;46:1832–4.
114. Ng EK, Leung TN, 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.
115. 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.
116. Chitty LS, Van der Schoot CE, Hahn S, Avent ND. SAFE—The Special Non-invasive Advances in Fetal and Neonatal Evaluation Network: aims and achievements. *Prenat Diagn.* 2008; 28:83–8.
117. Hahn S, Zhong XY, Holzgreve W. Recent progress in non-invasive prenatal diagnosis. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2008; 13:57–62.