

El diagnóstico prenatal no invasor: análisis de células y ADN fetal circulantes en la sangre materna

Natalia Olaya¹, Diana Jaramillo Posada²

RESUMEN

El diagnóstico prenatal temprano y no invasor por medio del análisis de células o ADN fetales circulantes en la sangre materna es un área prometedora de la obstetricia moderna. Entre las enfermedades que se pueden diagnosticar o cuyo comportamiento es posible predecir por estos métodos se encuentran la preeclampsia, la restricción del crecimiento intrauterino y el parto pretérmino. Algunas condiciones fetales que podrían detectarse son el sexo, ciertas anomalías cromosómicas y los defectos de un solo gen. Sin embargo, estas técnicas tienen limitaciones y hasta el momento no se practican de manera rutinaria. Con esta revisión pretendemos darles a los lectores información actualizada sobre las principales técnicas para el estudio de las células y el ADN fetales circulantes en la sangre materna y sus aplicaciones. Para tal fin se hizo una búsqueda en revistas indexadas hasta 2008 en las bases Pubmed, Scielo y Latindex y se escogieron, a juicio de las autoras, artículos especialmente relevantes.

Palabras clave

ADN fetal, Células fetales, Diagnóstico prenatal, Sangre materna

SUMMARY

Non invasive prenatal diagnosis: analysis of circulating fetal DNA and cells in maternal blood

Prenatal non invasive diagnosis by means of analyses of foetal DNA or cells circulating in maternal blood is one of the most promising areas of obstetrics. Among maternal diseases that could be diagnosed by these methods, or whose behaviour could be predicted, are preeclampsia, growth restriction and preterm labour. Some foetal conditions that could be detected are sex, chromosomal anomalies and single-gene defects. However, these are complex and expensive techniques that are not regularly performed in health care institutions. With this review we intend to provide the readers with up to date information on the main techniques available for the study of circulating foetal cells and DNA, and on their possible clinical applications. The review was based on a search for journals indexed up to 2008 in Pubmed, Scielo and Latindex. Especially relevant articles were chosen by the authors.

¹ Profesora auxiliar, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

² Profesora asistente, Departamento de Ginecología y Obstetricia, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
Direcciones: nomorales@quimbaya.udea.edu.co; jaramillo.diana@gmail.com

Recibido: septiembre 30 de 2008

Aceptado: junio 11 de 2009

Key words

Foetal cells, Foetal DNA, Maternal blood, Prenatal diagnosis

INTRODUCCIÓN

La mortalidad y la morbilidad maternas y perinatales siguen siendo elevadas en el mundo; se calcula que una mujer fallece cada minuto como consecuencia del proceso reproductivo. Además, de los 130 millones de niños que nacen cada año mueren 4 millones en la primera semana de vida y por cada uno de ellos hay un mortinato.¹ El 98% de estas muertes ocurren en países del tercer mundo. En Colombia, la situación es especialmente preocupante: según estadísticas vitales del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), hay 104,5 muertes maternas por cada 100.000 nacidos vivos.² La tasa de mortalidad perinatal, por otra parte, es en Colombia de 24 por cada 1.000 nacidos vivos.^{2,3}

Entre las causas más importantes de muerte materna, tanto en el mundo en general como en Colombia, están la preeclampsia, la hemorragia posparto y las infecciones. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la muerte perinatal ocurre especialmente por restricción del crecimiento intrauterino, parto prematuro, bajo peso al nacer y anomalías congénitas.^{4,5} No existe en la actualidad ninguna prueba que permita predecir con certeza el desarrollo de estas complicaciones. Para la preeclampsia y el parto pretérmino se utilizan ciertos elementos de la evaluación clínica, entre ellos la curva de presión arterial, la ganancia de peso durante la gestación y la cervicometría; la desventaja de estos es que son de baja sensibilidad o requieren personal entrenado, equipo especializado y acceso a los servicios de salud.⁶

Por otra parte, para el estudio de las alteraciones cromosómicas fetales existen pruebas de tamización ecográfica y de laboratorio como la medición de la sonolucencia nuchal entre las semanas once y catorce de la gestación y el tamización cuádruple. La determinación de la sonolucencia nuchal es útil; sin embargo, al igual que la cervicometría, necesita personal calificado. En cuanto al tamización cuádruple, es costoso y requiere un laboratorio especializado.^{7,8} En general, el ultrasonido como método diagnóstico de malformaciones fetales tiene una sensibilidad del 60%.^{9,10} El uso de este tipo de ecografías, llamado de tercer nivel, no está contemplado

como parte del protocolo oficial de control prenatal que se realiza a las mujeres embarazadas cuya gestación sea de bajo riesgo obstétrico.

Por otra parte, aunque en Colombia están disponibles las técnicas de biología molecular así como el personal calificado para practicarlas, solo se utilizan en casos seleccionados. Hasta el momento, no se encuentran disponibles para hacer el diagnóstico prenatal de rutina de enfermedades a partir de ácidos nucleicos circulantes en la sangre materna.

Es importante aclarar que cualquiera sea el diagnóstico obtenido por medio de estas pruebas, es presuntivo; su confirmación o diagnóstico definitivo requiere el uso de técnicas invasoras, no exentas de riesgo, como la amniocentesis, la cordocentesis y la biopsia de las vellosidades coriónicas.¹¹

En años recientes se ha utilizado el análisis de células y ADN fetales en la sangre materna por medio de diversas técnicas para predecir la aparición de preeclampsia, la restricción del crecimiento intrauterino y el parto prematuro y para diagnosticar anomalías genéticas.¹²⁻¹⁴ En este artículo se presentan los principales avances teóricos y técnicos de dichos procedimientos, así como sus aplicaciones actuales. Se intenta responder a los interrogantes sobre las perspectivas futuras de utilización en el mundo en general y en Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de obtener información acerca del análisis de la sangre materna para buscar ácidos nucleicos y células circulantes, se revisaron las bases de datos Pubmed, Scielo y Latindex. Se incluyeron artículos de revistas hasta 2008 incluido y se seleccionaron algunos entre aquellos que las autoras consideraron especialmente relevantes.

ORIGEN Y PRESENCIA DEL ADN Y LAS CÉLULAS FETALES EN LA SANGRE MATERNA

Desde hace más de un siglo se sabe que las células fetales pueden atravesar las barreras vasculares y encontrarse en la circulación materna.¹⁵ La frecuencia con la cual se encuentran en las mujeres normales es muy baja: una célula fetal en 10 millones de eritrocitos.¹⁵ Entre las células circulantes que se han estudiado se encuentran los eritrocitos, las células sanguíneas progenitoras y el trofoblasto.¹⁶⁻²⁰

Durante el embarazo se puede encontrar ADN fetal circulante en la sangre periférica de la madre. Su concentración aumenta en el plasma materno a lo largo del embarazo.²¹ Se han planteado varias teorías para explicar la presencia de ADN fetal libre en la sangre materna. Inicialmente se pensó que procedía de las células hematopoyéticas fetales; sin embargo, las células fetales intactas son raras en la sangre materna y es improbable que un número tan bajo de células explique la cantidad relativamente alta de ADN fetal libre circulante.¹⁵

En condiciones normales, el sincitiotrofoblasto viejo o en malas condiciones sale hacia la circulación materna como nudos sincitiales que los pulmones filtran y remueven²² (Figura n.º 1). Este sincitiotrofoblasto sufre apoptosis antes de salir a la circulación.²³ La tasa de fusión sincitial excede la requerida para el crecimiento de las vellosidades y, en consecuencia, se liberan diariamente más de tres gramos de sincitiotrofoblasto en el tercer trimestre en la circulación materna.²²

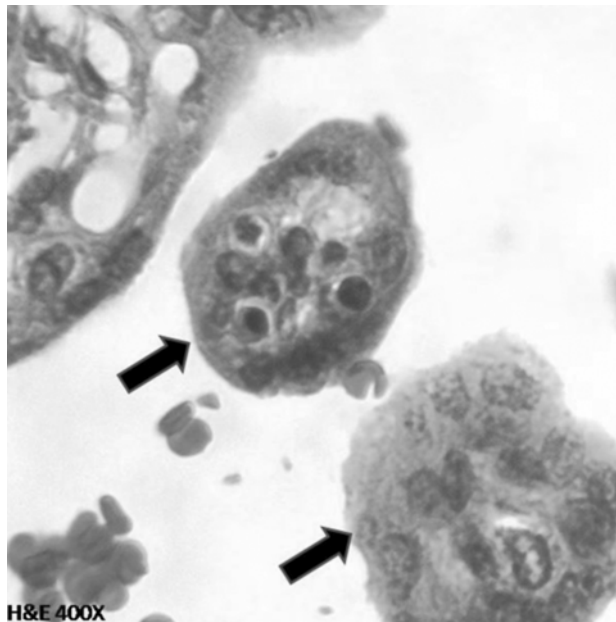


Figura n.º 1. Fotografía de nudos sincitiales. Placenta de 35 semanas. H&E 400X

EVALUACIÓN DEL ADN FETAL EN LA SANGRE MATERNA

La placenta, con su gran tamaño e intensa actividad celular fetal, es otra posible fuente de ADN; algunos trabajos han mostrado la relación que existe entre una mayor cantidad de ADN fetal libre circulante y la edad gestacional avanzada.²⁴⁻²⁷ La secuencia génica *SRY* del cromosoma *Y* se ha encontrado en la sangre materna desde el día 14 posconcepción.²⁵ Este dato sorprende cuando se considera que la circulación fetoplacentaria no se establece sino al día 28 posconcepción; para esa fecha el 80% de las mujeres ya tienen ADN fetal circulando en la sangre.²⁸

El trofoblasto, que aparece durante la segunda semana posconcepción y persiste en el organismo por varios días después de un aborto, podría explicar la presencia de ADN desde el comienzo de la gestación.²⁸ Tjoa encontró, en un modelo *ex vivo*, una relación directa entre la apoptosis y la necrosis del trofoblasto y la liberación de ADN, lo cual sugiere que el trofoblasto es la fuente de buena parte del ADN circulante.²⁷ Además, se ha encontrado ADN circulante en embarazos anembrionados, lo cual apoya esta hipótesis.²⁸

ANÁLISIS DE ADN Y CÉLULAS CIRCULANTES EN LA SANGRE MATERNA

Para obtener células y ADN fetales en la sangre materna se requieren entre 5 y 25 mL.²⁹⁻³¹ Con el fin de preservar los ácidos nucleicos y las células fetales se recomienda agregar formaldehído.³² Una vez obtenida la muestra, se pueden aplicar diversas técnicas de biología celular y molecular, entre ellas: citocentrifugación, inmunocitoquímica, hibridación *in situ* y reacción en cadena de la polimerasa, secuenciamiento y análisis de metilación del ADN.^{12,13,33,34}

Para extraer las células fetales de la sangre materna se deben lisar los glóbulos rojos y eliminar los leucocitos, después de lo cual se centrifuga la muestra y se hacen extendidos en láminas. Estas se colorean por técnicas rutinarias de histoquímica o se detectan sobre ellas proteínas específicas de las células trofoblásticas. El objetivo de este procesamiento es evaluar la morfología y contar las células trofoblásticas por mililitro de sangre materna.^{35,36}

El ADN se obtiene a partir de la sangre materna luego de lisar los glóbulos rojos. Para ello se utiliza cualquier protocolo comercial o no para la extracción de ADN.³⁷

APLICACIONES BÁSICAS DEL ADN LIBRE O DE LAS CÉLULAS FETALES CIRCULANTES

Aunque es relativamente fácil extraer ADN fetal a partir de la sangre materna, es difícil hacer ciertas aplicaciones diagnósticas porque la cantidad de ADN fetal es apenas del 3,4% del ADN total extraído durante el primer y segundo trimestres.³⁰ Además, es difícil distinguir los genes fetales de los maternos, y por esta razón, los trabajos publicados hasta la fecha se han llevado a cabo principalmente con series de fetos de sexo masculino.³⁸⁻⁴⁰ Las aplicaciones básicas de los ácidos nucleicos circulantes en la sangre materna son las siguientes:

1. **Determinación del sexo:** se puede hacer en dos formas: la PCR para secuencias específicas del cromosoma Y o la hibridación *in situ* para las mismas secuencias en células del trofoblasto.
2. **Detección de trastornos genéticos:** aneuploidía y defectos de un solo gen.
3. **Seguimiento y detección de complicaciones de la gestación:** preeclampsia, restricción del crecimiento, parto pretérmino.

ALTERACIONES DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN Y DEL NÚMERO DE CÉLULAS

Se ha encontrado que el nivel de ADN fetal está elevado en la sangre de mujeres con diversas alteraciones genéticas y clínicas.³⁴ Un caso interesante es el de aquellas que finalmente desarrollarán preeclampsia. Esta enfermedad propia del embarazo tiene un impacto importante en la morbilidad materna y perinatal, especialmente en los países en desarrollo.⁴¹ Aunque no se sabe muy bien cuál es la causa, se ha encontrado que existe una disfunción endotelial acompañada de un problema en la placentación.⁴² Las mujeres que padecen esta enfermedad presentan en la sangre un nivel de ADN fetal hasta cinco veces mayor que el de las gestantes que no la sufren.^{43,44} El estudio de Lau se diseñó con el fin de determinar si existe un aumento de este nivel antes de la manifestación clínica de la enfermedad. Los resultados mostraron que el nivel aumentado de ADN

fetal podría seleccionar a un grupo de pacientes susceptibles de sufrir preeclampsia. Los autores propusieron dos posibles mecanismos para el incremento del nivel de ADN fetal en la sangre materna, a saber: 1. Mayor liberación de dicho ADN por más abundante entrada de células del feto, tales como el trofoblasto y los eritroblastos, a la circulación materna. 2. Merma en la depuración del ADN fetal. Este último mecanismo se propuso porque el riñón y el hígado son los órganos encargados de esta función y ambos pueden estar afectados en la paciente con preeclampsia.

Otra forma de aumentar el nivel de ADN fetal en la sangre materna es el ingreso a esta de células muertas de la placenta como consecuencia del proceso de apoptosis que se ha descrito en las placentas de mujeres con preeclampsia.⁴⁵⁻⁴⁷

EL TROFOBlasto, LA PREECLAMPSIA Y EL RETRASO DEL CRECIMIENTO INTRAUTERINO

La preeclampsia es una enfermedad inflamatoria multisistémica que afecta en particular al riñón y al hígado de la madre, caracterizada clínicamente por hipertensión arterial y proteinuria. Se sabe que se origina por la exposición de la madre al trofoblasto placentario.⁴⁷ La preeclampsia es también un defecto de la placentación y de la diferenciación del trofoblasto, el cual se ve expuesto a estrés oxidativo.^{43,48} El crecimiento apropiado de las vellosidades placentarias determinaría en buena parte el éxito del proceso reproductivo. Según Mayhew y colaboradores, la presión de oxígeno en el espacio intervelloso se debe mantener baja. Así, la hiperoxia originaría anomalías del desarrollo de las vellosidades.⁴² Paradójicamente, en las placentas con preeclampsia hay proliferación del citotrofoblasto y nudos sincitiales, los cuales se han considerado clásicamente como signos de hipoxia.⁴⁶

Normalmente, el trofoblasto sufre un proceso de renovación cíclica durante el cual hay apoptosis y liberación de los llamados nudos sincitiales a la circulación materna. En madres con preeclampsia se ha encontrado un aumento de la liberación del trofoblasto hacia la sangre materna.⁴⁷ Según Chadda y colaboradores,⁴⁹ la hipoxia inhibe la fusión sincitial, lo cual precipitaría la necrosis del sincitiotrofoblasto e induciría una respuesta inflamatoria sistémica.

Tanto en la preeclampsia como en el retardo del crecimiento intrauterino hay aumento de la velocidad de renovación del trofoblasto, con aceleración de la apoptosis.⁴⁴ Sin embargo, también puede haber necrosis y aponecrosis.⁴⁸

La restricción del crecimiento intrauterino, al igual que la preeclampsia, se caracteriza por el funcionamiento patológico de la placenta. Este proceso involucra una invasión anormal del trofoblasto, modificación solo parcial o falta de modificación de las arterias espirales, aumento de la apoptosis de células del trofoblasto e isquemia placentaria.⁵⁰ Todo ello está relacionado con la liberación de proteínas como también de ADN y ARN fetales libres a la sangre materna, los cuales se pueden cuantificar en la sangre periférica y usarlos para predecir o detectar tempranamente la preeclampsia o la restricción del crecimiento intrauterino antes de que se manifiesten en la clínica.⁵⁰

Diferentes investigaciones han tratado de asociar la concentración de ADN fetal y el número de células fetales circulantes en las mujeres que tienen fetos con restricción del crecimiento intrauterino. Crowley y colaboradores⁵¹ encontraron que no existió ninguna correlación entre el ADN fetal libre o total en el plasma materno, cuantificado antes de la vigésima semana de la gestación, y la posibilidad de desarrollar retardo del crecimiento intrauterino o preeclampsia.

Por otro lado Caramelli y colaboradores⁵² diseñaron un estudio para definir si existe aumento en la concentración de ADN fetal en las mujeres cuya prueba tamiz del *doppler* de arterias uterinas es positiva para retardo del crecimiento intrauterino entre las semanas 20 y 35 de la gestación. Encontraron que en este grupo de pacientes sí existe un incremento del ADN mayor que en el grupo control y que el ADN fetal podría ser un marcador cuando las mujeres tienen un feto con restricción del crecimiento o en las que van a presentarla.

Recientemente, Nakamura y colaboradores demostraron que hay un perfil particular de ARN mensajero en la sangre de madres con preeclampsia.⁵³

Se ha sugerido que la ruptura de la barrera placentaria podría estar asociada con la presentación de un parto prematuro.^{54,55} Leung y colaboradores encontraron que el nivel de ADN circulante estaba elevado en un grupo de mujeres con parto pretérmino en quienes falló la terapia tocolítica.⁵⁶ Farina y colaboradores,⁵⁷ tratando

de buscar una correlación entre el tiempo de gestación y el nivel de ADN circulante en la sangre de mujeres con riesgo alto de parto prematuro, encontraron un nivel más alto que el normalmente esperado durante el tercer trimestre y que ese aumento se correlaciona con mayor incidencia de parto antes de la semana 34 de la gestación.

CONCLUSIÓN

Los procedimientos que utilizan el ADN y las células fetales circulantes en la sangre materna son técnicamente difíciles y tienen limitaciones pero se deben aprovechar para intentar hacer diagnósticos tempranos. El costo, aunque relativamente elevado, no debería ser una limitación para aplicarlos en la población colombiana. Inicialmente es necesario observar en dicha población, tan variable desde los puntos de vista genético y geográfico, el comportamiento de la cantidad de ADN y de la cantidad y calidad de las células circulantes y la frecuencia de malformaciones y otras enfermedades. En el futuro, estas técnicas podrán permitir observar si existe asociación entre las variaciones en estos parámetros y el desarrollo de las enfermedades más comunes; así mismo, podrían utilizarse para el diagnóstico de enfermedades, tanto maternas como fetales, y para la identificación temprana de anomalías genéticas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lawn JE, Cousens S, Zupan J. Neonatal survival 1:4 million neonatal deaths: When? Where? Why? *Lancet* 2005; 365: 891-900.
2. Departamento Nacional de Estadística (DANE), Colombia. Estadísticas vitales. Principales causas de mortalidad materna según lista de causas a tres caracteres, 2004. Disponible en http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/poblacion/defunciones/defunciones_2004p/CUADRO8_2004PxIs [Acceso 13 marzo de 2007].
3. Brea JA. Population dynamics in Latin America. In: *Population Bulletin*. Volume 58. Washington, D.C., Population Reference Bureau; 2003.
4. Ojeda G, Ordóñez M, Ochoa L. Salud Sexual y Reproductiva en Colombia. Encuesta Nacional de Demografía y Salud 2000. Cap X: 137-150. [Internet]. Disponible en: http://www.profamilia.org.co/encuestas/01encuestas/pdf_2000/10Capitulo10.pdf. [Acceso septiembre de 2007].

5. WHO. The newborn deaths that went unnoticed. En: The World Health Report 2005-Make every mother and child count. Disponible en <http://www.who.int/whr/2005/chapter1/en/index6.html> [Acceso agosto de 2009].
6. To MS, Fonseca EB, Molina FS, Cacho AM, Nicolaides KH. Maternal characteristics and cervical length in the prediction of spontaneous early preterm delivery in twins. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194: 1360-1365.
7. Wald NJ, Morris JK, Ibison J, Wu T, George LM. Screening in early pregnancy for pre-eclampsia using Down syndrome quadruple test markers. *Prenat Diagn* 2006; 26: 559-564.
8. Wald NJ, Huttly WJ, Rudnicka AR. Prenatal screening for Down syndrome: the problem of recurrent false-positives. *Prenat Diagn* 2004; 24: 389-392.
9. Duric K, Skrablin S, Lesin J, Kalafatic D, Kuvacic I, Suchanek E. Second trimester total human chorionic gonadotropin, alpha-fetoprotein and unconjugated estriol in predicting pregnancy complications other than fetal aneuploidy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 110: 12-15.
10. Raniga S, Desai PD, Parikh H. Ultrasonographic soft markers of aneuploidy in second trimester: are we lost? *MedGenMed* 2006; 11; 8: 9.
11. Shipp TD, Benacerraf BR, Cetin I, Foidart JM, Miozzo M, Raun T, et al. Second trimester ultrasound screening for chromosomal abnormalities. *Prenat Diagn* 2002; 22: 296-297.
12. Sekizawa A, Purwosunu Y, Matsuoka R, Koide K, Okazaki S, Farina A, et al. Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood. *Obstet Gynaecol Res* 2007; 33: 747-764.
13. 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 USA* 2008; 23; 105: 20458-20463.
14. 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: 500-511.
15. Hahn S, Holzgreve W. Fetal cells and cell-free fetal DNA in maternal blood: new insights into pre-eclampsia. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 501-508.
16. Leung TN, Zhang J, Lau TK, Chan LYS, Dennis Lo YM. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clin Chem* 2001; 47: 137-139.
17. O'Donoghue K, Choolani M, Chan J, de la Fuente J, Kumar S, Campagnoli C, et al. Identification of fetal mesenchymal stem cells in maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 497-502.
18. Al-Mufti R, Hambley H, Albaiges G, Lees C, Nicolaides KH. Increased fetal erythroblasts in women who subsequently develop pre-eclampsia. *Hum Reprod* 2000; 15: 1624-1628.
19. 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; 15:218-221.
20. Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Matsuoka R, Okai T, et al. Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 480-484.
21. Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 59-67.
22. Huppertz B, Kingdom JC. Apoptosis in the trophoblast: role of apoptosis in placental morphogenesis. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11: 353-362.
23. Lo YM. Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic applications *Clin Chem* 2000; 46: 1903-1906.
24. Illanes S, Denbow M, Kailasam C, Finning K, Soothill PW. Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Early Hum Dev* 2007; 83: 563-566.
25. Rijnders RJ, Van Der Loo 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. *Prenat Diagn* 2003 30; 23: 1042-1044.
26. Baczyk D, Dunk C, Huppertz B, Maxwell C, Reister F, Giannoulis D. Bi-potential behaviour of cytotrophoblasts in first trimester chorionic villi. *Placenta* 2006; 27: 367-374.
27. Tjota ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi DW, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free fetal-placental DNA. *Am J Pathol* 2006; 169: 400-404.
28. 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: 415-428.
29. Dhallan R, Au WC, Mattagajasingh S, Emche S, Bayliss P, Damewood M, et al. Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. *JAMA* 2004; 291: 1114-1119.

30. Dhallan R, Guo X, Emche S, Damewood M, Bayliss P, Cronin M, et al. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet* 2007; 369: 474-481.
31. Galbiati S, Smid M, Gambini D, Ferrari A, Restagno G, Viora E, et al. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Clin Chem* 2005; 51: 312-320.
32. Guetta E, Gutstein-Abo L, Barkai G. Trophoblasts isolated from the maternal circulation: In vitro expansion and potential application in non-invasive prenatal diagnosis. *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 337-339.
33. Li Y, Holzgreve W, Kiefer V, Hahn S. MALDI-TOF mass spectrometry compared with real-time PCR for detection of fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2006; 52: 2311-2312.
34. Birch L, English CA, O'Donoghue K, Barigye O, Fisk NM, Keer JT. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. *Clin Chem* 2005; 51: 312-320.
35. Purwosunu Y, Sekizawa A, Koide K, Okazaki S, Farina A, Okai T. Clinical potential for noninvasive prenatal diagnosis through detection of fetal cells in maternal blood. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2006; 45: 10-20.
36. Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem* 2004; 50: 1002-1011.
37. Tang NL, Leung TN, Zhang J, Lau TK, Lo YM. Detection of fetal-derived paternally inherited X-chromosome polymorphisms in maternal plasma. *Clin Chem* 1999; 45: 2033-2035.
38. Maron JL, Johnson KL, Slonim D, Lai CQ, Ramoni M, Alterovitz G, et al. Gene expression analysis in pregnant women and their infants identifies unique fetal biomarkers that circulate in maternal blood. *Clin Invest* 2007; 117: 3007-3019.
39. Pan PD, Peter I, Lambert-Messerlian GM, Canick JA, Bianchi DW, Johnson KL. Cell-free fetal DNA levels in pregnancies conceived by IVF. *Hum Reprod* 2005; 20: 3152-3156.
40. Wataganara T, Bianchi DW. Fetal cell-free nucleic acids in the maternal circulation: new clinical applications. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1022: 90-99.
41. Villar J, Carroli G, Wojdyla D, Abalos E, Giordano D, Ba'aqeel H, et al. Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine growth restriction, related or independent conditions? *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194: 921-931.
42. Mayhew TM, Charnock-Jones DS, Kaufmann P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta* 2004; 25: 127-129.
43. Holzgreve W, Ghezzi F, DiNaro E, Ganshirt D, Maymon E, Hahn S. Disturbed feto-maternal cell traffic in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1998; 91: 669-672.
44. Lau TW, Leung TN, Chan L, Lau TK, Chan A, Tam WH, et al. Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia. *Clin Chem* 2002; 48: 2141-2146.
45. Huppertz B, Frank HG, Kingdom JC, Reister F, Kaufmann P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol* 1998; 110: 495-498.
46. Huppertz B, Frank HG, Reister F, Kingdom J, Korr H, Kaufmann P. Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Lab Invest* 1999; 79: 1687-1692.
47. Kadyrov M, Kingdom JC, Huppertz B. Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194: 557-563.
48. Reister F, Frank HG, Kingdom JC, Heyl W, Kaufmann P, Rath W. Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women. *Lab Invest* 2001; 81: 1143-1152.
49. Chaddha V, Viero S, Huppertz B, Kingdom J. Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. *Semin Fetal Neonatal Med* 2004; 9: 357-359.
50. Reister F, Kingdom JC, Ruck P, Marzusch K, Heyl W, Pauer U, et al. Altered protease expression by periarterial trophoblast cells in severe early-onset preeclampsia with IUGR. *J Perinat Med* 2006; 34: 272-279.
51. Crowley A, Martin C, Fitzpatrick P, Sheils O, O'Herlihy C, O'Leary JJ, et al. Free fetal DNA is not increased before 20 weeks in intrauterine growth restriction or preeclampsia. *Prenat Diagn* 2007; 27: 174-179.
52. Caramelli E, Rizzo N, Concu M, Simonazzi G, Carinci P, Bondavalli C, et al. Cell-free fetal DNA concentration in plasma of patients with abnormal uterine artery Doppler waveform and intrauterine growth restriction: a pilot study. *Prenat Diagn* 2003; 23: 367-377.
53. Nakamura M, Sekizawa A, Purwosunu Y, Okazaki S, Farina A, Wibowo N, et al. Cellular mRNA expressions of

- anti-oxidant factors in the blood of preeclamptic women. *Am J Obst Gynecol* 2009; 386.e1-7.
54. Ananth CV, Vintzileos AM. Epidemiology of preterm birth and its clinical subtypes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006; 19: 773-782.
55. Bianchi DW. Fetal DNA in maternal plasma: the plot thickens and the placental barrier thins. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 763-764.
56. Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 1998; 352: 1904-1905.
57. Farina A, LeShane ES, Romero R, Gomez R, Chaiworapongsa T, Rizzo N, et al. High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a risk factor for spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 421-425.

