



Facultad de Ciencias
Departamento de Biología

ADN fetal en plasma materno: nuevas estrategias para el estudio de mutaciones de herencia paterna y diagnóstico prenatal no invasivo del sexo fetal

Fetal DNA in maternal plasma: new strategies for the study of mutations with a paternal origin and non-invasive prenatal diagnosis of fetal gender

TESIS DOCTORAL EUROPEA

Ana Bustamante Aragonés
Fundación Jiménez Díaz-Capio, CIBERER
Madrid, octubre 2008

La Doctora Carmen Ramos Corrales, Jefa Asociada del Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz,

CERTIFICA:

Que la presente tesis doctoral titulada: “*ADN fetal en plasma materno: nuevas estrategias para el estudio de mutaciones de origen paterno y diagnóstico prenatal no invasivo del sexo fetal*”, que presenta Dña. Ana Bustamante Aragonés para obtener el Grado de Doctor, ha sido realizada bajo mi dirección, autorizándola para su presentación al Tribunal Calificador.

Madrid, 14 de julio de 2008

VºBº

Fdo. Dra. Carmen Ramos Corrales
Directora de la Tesis Doctoral

Fdo. Prof. Juan José González Aguilera
Tutor de la Tesis Doctoral

A Óscar, a mis padres y a mi hermano

A mis abuelos

A toda mi familia

A vosotros

*No basta saber, se debe también aplicar.
No es suficiente querer, se debe también hacer.*

Johann Wolfgang Goethe (1749-1832)

Poeta y dramaturgo alemán

AGRADECIMIENTOS

ACKNOWLEDGEMENTS

En este trabajo han intervenido, tanto científica como personalmente, diversas personas. Todas ellas se merecen al menos unas líneas de este manuscrito ya que, de una manera u otra, han puesto su granito de arena.

En primer lugar debo agradecer a Carmen Ramos la confianza que depositó en mí, algunos años atrás. Gracias a ella, hoy en día puedo estar escribiendo estas líneas. Gracias Carmen por el ánimo, ilusión y conocimientos que me has transmitido a lo largo de estos años. Gracias a ti he orientado mi vida profesional en una línea apasionante.

También debo agradecer a Carmen Ayuso su apoyo, ayuda y confianza. Muchas gracias Carmen por todo lo que luchas por el laboratorio y, de manera personal, por el apoyo que das a nuestro trabajo, haciéndonos “publicidad” allá donde vas a dar una charla. Gracias.

A Marta. Has sido un gran apoyo durante todos estos años. Siempre has estado ahí para ayudarme con todo. Gracias.

A todos mis compañeros del laboratorio de Genética de la FJD. María José, Chony, Rosa, Diego, Miguel, Jana, Rocío, Cristina V, Aurora, Tere, Toñi, Cristina González, Nuria, Mónica, Belén, Fernando y María Fenollar, os agradezco los buenos y, a veces no tan buenos, momentos que hemos pasado juntos. Siempre habéis puesto lo mejor de vosotros cuando os he pedido ayuda, muchas gracias a todos.

- ◆ A Dan y Elena. Sois una de las cosas que hacen que me enorgullezca de haber llegado un día al laboratorio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz. Me habéis hecho reír muchísimo y además siempre estáis ahí para todo.
- ◆ A Almu. Gracias por poder contar contigo para cualquier cosa tanto dentro como fuera del laboratorio.
- ◆ A María. Gracias Mary por todo lo que me enseñaste cuando era tu “pequeño saltamontes”. Lo que aprendí contigo ha sido la base de todo este trabajo. Muchas gracias.
- ◆ A Isa. Eres la paz del laboratorio. Gracias por la serenidad, fuerza y naturalidad que transmites, sin olvidar las buenas ideas que me has ido dando durante estos años. Eres una persona especial dentro del laboratorio.
- ◆ A Jesús. Como siempre me pides que te ponga en los agradecimientos... No haría falta que lo pidieses porque debes saber que siempre te agradeceré la ayuda que me has prestado en cualquier cosa que he necesitado. Gracias por compartir conmigo la ilusión de probar nuevas cosas. Gracias.
- ◆ A Carmen Laura. Gracias por tu comprensión y paciencia durante esta última etapa de la tesis.
- ◆ A Eva. Has llegado hace poco al laboratorio pero te has ganado rápidamente nuestro cariño y aprecio. Además debo agradecerte la ayuda que has prestado en estos últimos meses. Sigue con ese entusiasmo por aprender porque eso te hace muy valiosa.

Hay también otras personas que, sin pertenecer directamente al laboratorio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz, han sido partícipes de este trabajo, ayudándome con mucho cariño y dedicándome parte de su tiempo: Marisa, Dr. Plaza, Dr. Díaz Recasens, personal del servicio de extracciones, Rosa García, Pilar Palomino, Piluca, Rosa (Neuro), Carmen (Neuro), Luis Arnés, Pilar Tornero, Juan Moreno y Valentín Calvo.

Además, también debo agradecer su colaboración a otras personas pertenecientes a otros centros hospitalarios o instituciones académicas como son Celia Pérez, Belén Pérez, Magdalena Ugarte y Guillermo Glover.

A Juan José González Aguilera, tutor del presente trabajo. Gracias por tu colaboración y amabilidad.

Many thanks to the people from the Center of Human Genetics of the Gasthuisberg Hospital. Special thanks to Joris Vermeesch and Gert Mathijis for the opportunity they gave me for a stay in their lab. Special thanks to Valerie Race and Filip Christiaens.

A los pacientes. Gracias por apoyar nuestros estudios y participar activamente. Vosotros habéis hecho posible esta Tesis. Espero que todo este esfuerzo sea recompensado algún día con el traslado a la práctica clínica de estos estudios. Muchas Gracias.

A la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz. Nunca se me olvidará el día en el que me concedisteis la beca. Gracias por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo. Vuestra labor es admirable.

Al CIBERER. Gracias por haber financiado parte del trabajo.

A mis amigas. Después de 23 años juntas, gracias por estar siempre ahí, para los buenos y malos momentos.

A mi familia: mis padres, mi hermano y Óscar. Cómo agradecer el apoyo y paciencia que me habéis brindado durante estos años.

A mi madre. La idea de iniciarme en la genética fue tuya, por lo que este gran parte de este trabajo ha sido posible gracias a ti. Gracias por tus consejos y por tu constante apoyo.

A mi padre, porque siempre me escuchas, orientas y aconsejas.

A mi hermano. Gracias por enseñarnos a ver el mundo desde otros ojos.

A Óscar. Gracias por tu paciencia, por la gran confianza que pones en mí, por tu apoyo constante para superarme cada día y, sobre todo, por el gran entusiasmo que muestras con mi trabajo.

También me gustaría brindar un agradecimiento especial a mis abuelos, que a pesar de su edad, se siguen interesando por los “*descubrimientos*” que hace su nieta. **Os quiero muchos a todos.**

ÍNDICE

TABLE OF CONTENTS

Agradecimientos <i>Acknowledgements</i>	I
Clave de Abreviaturas <i>Abbreviations</i>	XI
1. Introducción <i>Introduction</i>	1
1.1 Diagnóstico prenatal	3
1.1.1 Pruebas no invasivas	5
1.1.1.1 Cribaje Bioquímico	5
1.1.1.2 Ecografía	6
1.1.2 Pruebas invasivas	6
1.2 Diagnóstico prenatal genético no invasivo (DPNI)	9
1.2.1 Células fetales en sangre materna	10
1.2.2 ADN fetal libre circulante en sangre materna	13
1.2.2.1 Descubrimiento	13
1.2.2.2 Biología	14
1.2.2.3 Origen trofoblástico	15
1.2.2.4 Enriquecimiento y aislamiento	18
1.2.2.5 Epigenética	19
1.2.3 ARN fetal en sangre materna	21
1.2.4 Aplicación clínica del DPNI	22
1.2.4.1 Diagnóstico del sexo fetal	23
1.2.4.2 Diagnóstico del factor Rh fetal	24
1.2.4.3 Diagnóstico de enfermedades monogénicas	25
1.2.4.4 Diagnóstico de aneuploidías	26
1.2.5 Investigación traslacional en el DPNI	27
1.3 Aportaciones del presente trabajo al DPNI	28
1.3.1 Introducción de nuevas tecnologías en el DPNI	28
1.3.1.1 Antecedentes	28
1.3.1.2 Nuevas técnicas analíticas en DPNI	30
1.3.1.2.1 DHPLC	31
1.3.1.2.2 Minisequenciación	32
1.3.1.2.3 <i>High Resolution Melting</i>	33
1.3.2 Estudio de enfermedades monogénicas	34
1.3.2.1 Enfermedades de herencia dominante	34
1.3.2.1.1 Corea de Huntington	34

1.3.2.2	Enfermedades de herencia recesiva	35
1.3.2.2.1	Amaurosis congénita de Leber	35
1.3.2.2.2	Fibrosis quística	35
1.3.2.2.3	Acidemia propiónica	36
1.3.2.3	Enfermedades ligadas al cromosoma X	37
1.3.2.3.1	Retinosis pigmentaria ligada al cromosoma X	37
1.3.3	Introducción a la práctica clínica de la determinación del sexo fetal	38
1.4	Estado actual del DPNI en la práctica clínica	38
2.	Objetivos <i>Aims of the work</i> _____	39
2.1	Objetivo general	41
2.2	Objetivos concretos	41
3.	Metodología general <i>General methodology</i> _____	43
3.1	Esquema general de la metodología seguida	45
4.	Resultados <i>Results</i> _____	47
4.1	Diagnóstico prenatal en plasma materno de la enfermedad de Huntington: estudio directo e indirecto	49
	<i>Prenatal Diagnosis of Huntington disease in maternal plasma: direct and indirect study.</i>	51
4.2	Diagnóstico prenatal no-invasivo de una mutación fetal en el gen CRB1 asociada a amaurosis congénita de Leber	63
	<i>Early noninvasive prenatal detection of a CRB1 mutation causing Leber congenital amaurosis.</i>	65
4.3	Nueva estrategia para la detección/exclusión prenatal en plasma materno de mutaciones de origen paterno asociadas a fibrosis quística	77
	<i>New strategy for the prenatal detection/exclusion of paternal cystic fibrosis mutations in maternal plasma.</i>	79
4.4	Diagnóstico prenatal en plasma materno de una mutación fetal asociada a acidemia propiónica	85
	<i>Prenatal diagnosis in maternal plasma of a fetal mutation causing propionic acidemia.</i>	87
4.5	Detección en plasma materno de una mutación fetal responsable de retinosis pigmentaria mediante secuenciación automática.	91
	<i>Detection of a paternally inherited fetal mutation in maternal plasma by the use of automated sequencing.</i>	93

4.6 Determinación del sexo fetal en sangre materna a partir de la séptima semana de gestación. Implicación clínica en gestantes portadoras de hemofilia.	103
<i>Foetal sex determination in maternal blood from the seventh week of gestation and its role in diagnosing haemophilia in the foetuses of female carriers.</i>	105
5. Discusión <i>Discussion</i> _____	111
5.1 Estudio de enfermedades monogénicas	113
5.1.1 Enfermedad monogénica dominante	114
5.1.1.1 Diagnóstico prenatal de corea de Huntington	115
5.1.2 Enfermedades monogénicas recesivas	117
5.1.2.1 Diagnóstico prenatal de amaurosis congénita de Leber	118
5.1.2.2 Diagnóstico prenatal de fibrosis quística	119
5.1.2.3 Diagnóstico prenatal de acidemia propiónica	121
5.1.3 Enfermedades ligadas al sexo	123
5.1.4.1 Diagnóstico prenatal de retinosis pigmentaria ligada al X	123
5.1.4 Valoración de las distintas técnicas empleadas para el estudio de mutaciones fetales de origen paterno	125
5.2 Incorporación a la práctica clínica de la determinación del sexo fetal	126
5.3 Futuras direcciones	128
6. Conclusiones <i>Conclusions</i> _____	131
7. Bibliografía <i>References</i> _____	137

CLAVE DE ABREVIATURAS

ABBREVIATIONS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP	Acidemia Propiónica
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
B-HcG	Beta gonadotropina coriónica
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator gene</i>
CH (HD)	Corea de Huntington (del inglés <i>Huntington Disease</i>)
dHPLC	<i>denaturing High Performance Liquid Chromatography</i>
DPNI	Diagnóstico Prenatal No Invasivo
DDNTP	Dideoxinucleótido
FISH	<i>Fluorescence in situ Hybridization</i>
FQ	Fibrosis Quística
H19	<i>Adult skeletal muscle gene</i>
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
IGF2	<i>Insulin-like growth factor II</i>
IgG	Inmunoglobulina G
IT15	<i>Huntington disease gene</i>
IVE	Interrupción Voluntaria del Embarazo
LCA	Amaurosis Congénita de Leber (del inglés <i>Leber Congenital Amaurosis</i>)
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAPP-A	Proteína asociada al embarazo
PB	Pares de Bases
PCCA	<i>Alpha-subunit Propionyl-CoA carboxylase gene</i>
PCCB	<i>Beta-subunit Propionyl-CoA carboxylase gene</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PNA-Clamp PCR	<i>Peptide Nucleic Acid-clamp PCR</i>
QF-PCR	<i>Quantitative Fluorescent- Polymerase Chain Reaction</i>
RASSF1A	<i>Ras Association domain Family protein 1 gene</i>
RH	<i>Rhesus</i>
RP	Retinosis Pigmentaria

RP2	<i>Retinitis Pigmentosa 2 gene</i>
RPGR	<i>Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator gene</i>
SERPINB5	<i>Protease Inhibitor 5 gene</i>
SNPs	Polimorfismo nucleotídico (del inglés <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
XLRP	Retinosis Pigmentaria ligada al X (del inglés <i>X-linked Retinitis Pigmentosa</i>)

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCTION

1.1 Diagnóstico prenatal

En los últimos veinte años, debido al avance de las investigaciones médicas y la introducción de nuevas tecnologías, se ha alcanzado un mayor conocimiento del feto, que ha posibilitado el diagnóstico prenatal de un gran número de defectos congénitos. El diagnóstico prenatal es definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la detección de cualquier defecto congénito del feto; es decir, “cualquier anomalía en el desarrollo morfológico, estructural, funcional o molecular presente al nacer (aunque pueda manifestarse más tarde) externa o interna, familiar o esporádica, hereditaria o no y única o múltiple”. Según esta definición, el defecto congénito puede alcanzar una frecuencia de aproximadamente entre el 3 y el 6% de todos los fetos, en función de los criterios neonatales que se utilicen para definir a un nacido como normal o portador de un defecto congénito.

El diagnóstico prenatal no se limita a la detección de anomalías fetales ni a la posibilidad de una interrupción voluntaria del embarazo en el caso de fetos con un defecto congénito. Sus objetivos también incluyen el consejo genético previo a la gestación que se imparte a una pareja con riesgo de tener un hijo con un determinado defecto, ya que se les informa de la posibilidad de conocer la presencia o ausencia de dicho defecto en el feto. Previo a la existencia de esta posibilidad, muchas parejas en esta situación renunciaban a tener descendencia. Sin embargo, hoy día la medicina ofrece la posibilidad de diagnosticar una determinada alteración en el estadio fetal. Por lo tanto este diagnóstico proporciona información, seguridad y reducción de la ansiedad en las parejas con un feto en riesgo de un determinado defecto congénito.

El diagnóstico prenatal nace de la posibilidad de acceder al feto. La primera aproximación prenatal se realiza en 1966, año en el que se consiguen los primeros cultivos de células de líquido amniótico (Steele y Breg, 1966). Un año más tarde, se realizó el primer diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas (Jacobson y Barter, 1967). Posteriormente, se fueron realizando diversos estudios de diferentes cromosopatías y errores congénitos del metabolismo. Brock y cols determinaron en 1972 la utilidad de la medición de α -fetoproteína en sangre materna para el diagnóstico prenatal de defectos del cierre del tubo neural.

La introducción de la ecografía bidimensional, en la actualidad la prueba obstétrica por excelencia, tuvo lugar durante los años sesenta. Esta prueba permitió el estudio morfológico del feto y, aunque en un principio sólo las anomalías más groseras podían ser detectadas, en la actualidad permite el diagnóstico de más del 80% de los defectos congénitos con manifestación morfológica. Hoy en día esta técnica se realiza rutinariamente en las consultas de obstetricia para el seguimiento del embarazo, además de ser un elemento de soporte indispensable para la realización de las técnicas obstétricas prenatales invasivas.

En 1983 se utilizaron por primera vez las vellosidades coriales para el diagnóstico de anomalías cromosómicas (Brambati y Simoni, 1983; Ramos y cols., 1984). Esta nueva técnica se presentó como una alternativa al cultivo de líquido amniótico, permitiendo el estudio cromosómico, molecular y bioquímico del feto en el primer trimestre de gestación.

El campo del diagnóstico prenatal sigue avanzando con el fin de permitir cada vez diagnósticos más tempranos y fiables. La ecografía tridimensional, la cual incorpora una tercera dimensión a la ya existente ecografía obstétrica, es una de las últimas adquisiciones en este campo, permitiendo el estudio morfológico del feto en mayor detalle.

En la actualidad el diagnóstico prenatal engloba un conjunto de pruebas obstétricas que se pueden dividir en invasivas o no invasivas según impliquen o no la invasión del medio intrauterino. Las pruebas no invasivas, ecografía y cribado bioquímico, son empleadas rutinariamente en obstetricia. Sin embargo, las pruebas invasivas, las cuales se realizan para la recogida de tejido fetal y que comprometen el bienestar fetal, son realizadas únicamente en aquellos casos en los que existe un riesgo, superior al del resto de la población de gestantes, de que el feto presente algún defecto genético (Figura 1.1).

1.1.1 Pruebas no invasivas

Las pruebas prenatales no invasivas clásicas agrupan el cribaje bioquímico y la ecografía.

1.1.1.1 Cribaje bioquímico

Desde el momento de la concepción hay diferentes proteínas y hormonas sintetizadas por el feto, la placenta o ambos, que varían sus valores en el torrente circulatorio materno. La medida de estos valores puede emplearse como un indicador del estado fetal ya que la concentración de estos marcadores bioquímicos se encuentra alterada en gestaciones con fetos portadores de determinadas anomalías cromosómicas. Sin embargo, para la correcta interpretación de estos indicadores bioquímicos, hay que considerar diversos factores del embarazo como edad gestacional, raza, embarazos múltiples y diabetes, los cuales también alteran las concentraciones de estas moléculas pudiendo restar fiabilidad a este análisis. Según el trimestre de gestación en el que se realiza el cribado bioquímico, se miden unas proteínas u otras:

- ❖ Análisis en el primer trimestre de gestación: PAPP-A (proteína placentaria Asociada al embarazo) y β HcG (beta gonadotropina coriónica). Ambas proteínas placentarias presentan valores alterados en gestaciones con un feto Síndrome de Down debido a la inmadurez placentaria de estos fetos: la proteína PAPP-A está disminuida mientras que los niveles de β HcG están por encima de los normales.
- ❖ Análisis en el segundo trimestre de gestación: α -fetoproteína, Inhibin A y uE3 (estradiol). La α -fetoproteína se encuentra disminuida en el 25% de las gestaciones de fetos síndrome de Down y sus valores son elevados en casos de fetos con defectos de cierre del tubo neural.

La evaluación conjunta del cribaje bioquímico junto con la edad materna y la medida del pliegue nuchal del feto, es el test integrado recomendado para el cribaje de

determinadas aneuploidías en el primer trimestre de gestación (Nicolaidis y cols., 2005; Kagan y cols., 2008).

1.1.1.2 Ecografía

La ecografía obstétrica consiste en la visualización del embrión o feto dentro del útero materno mediante ultrasonidos. Se trata de un método de diagnóstico imprescindible en el seguimiento del embarazo. Dada la información que proporciona, la ecografía se practica rutinariamente en todas las gestantes.

Mediante esta técnica se detectan el 80% de los defectos congénitos con manifestación morfológica. Sin embargo cada vez son más las malformaciones congénitas diagnosticadas por ecografía, dato que depende de la experiencia del ecografista así como de la resolución del ecógrafo utilizado. La ultrasonografía además de ser una técnica diagnóstica, representa un soporte indispensable para la realización de técnicas obstétricas prenatales como la amniocentesis, la biopsia corial o la funiculocentesis.

1.1.2 Pruebas invasivas

El diagnóstico citogenético y molecular prenatal se realiza a partir de células procedentes de tejido fetal. Para la obtención de dicho tejido fetal se necesita acceder al medio intrauterino mediante unas técnicas obstétricas invasivas. La principal desventaja de estas técnicas es el riesgo de pérdida fetal que se cifra entre el 0,5-3%. Además, desde un punto de vista psicológico, la realización de estas pruebas genera gran ansiedad y estrés en la gestante. Estas pruebas no se ofrecen de manera general a toda la población de gestantes sino únicamente a la población en riesgo (Figura 1.1).

Figura 1.1. Indicaciones para la realización de un Diagnóstico Prenatal invasivo

- Edad materna avanzada (> 35 años)
- Feto con parámetros ecográficos y/o bioquímicos alterados
- Embarazo anterior con cromosomopatía
- Anomalia cromosómica parental
- Historia familiar de alguna enfermedad genética heredada y diagnosticable

Las técnicas obstétricas invasivas son tres:

- ❖ *Biopsia corial*: prueba en la que se recoge una muestra de vellosidades coriales. Se realiza a partir de la 10ª semana de gestación. Conlleva un riesgo de pérdida fetal que oscila entre el 1-2% (Figura 1.2).
- ❖ *Amniocentesis*: mediante una punción abdominal se obtiene una muestra de líquido amniótico de la cavidad amniótica. Se realiza en el segundo trimestre de gestación, principalmente entre la semana 15 y la semana 20 de embarazo. Tiene un riesgo de pérdida fetal algo menor que el asociado a la biopsia corial, entre el 0,5-1% (Figura 1.2).

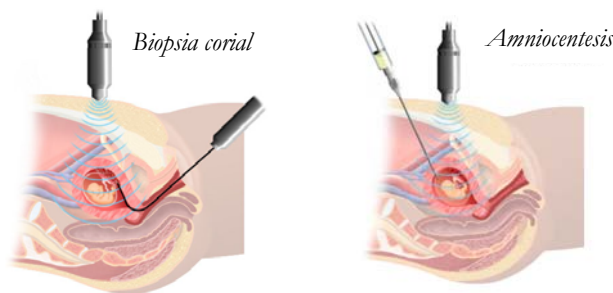


Figura 1.2. Técnicas prenatales invasivas.

- ❖ *Cordocentesis o funiculocentesis*: recogida de sangre fetal a través del cordón umbilical. Se realiza en edades avanzadas de gestación a partir de la semana 20. Esta prueba conlleva un riesgo de pérdida fetal comprendido entre el 2-3%.

Mediante estas técnicas se obtiene tejido fetal a partir del cual se puede realizar un estudio cromosómico (cariotipo), un diagnóstico rápido de las aneuploidías más frecuentes y/o estudios moleculares dirigidos de determinados defectos genéticos. Para el estudio de estos últimos, la biopsia corial es la prueba preferente debido a que es la más precoz y en la que se recoge mayor cantidad de tejido fetal para la posterior extracción de ADN.

El 80% de los casos de diagnóstico prenatal se realizan para la obtención de un cariotipo fetal. Esta prueba revela el componente cromosómico del feto evidenciando la posible presencia de anomalías estructurales o numéricas. La realización de un cariotipo requiere de un cultivo celular, lo cual retrasa el diagnóstico entre 15-21 días. Sin embargo, alternativamente a esta prueba, existen otros métodos de diagnóstico rápido de aneuploidías, como la técnica de FISH (Fluorescence in-situ hybridization) o la de QF-PCR (Quantitative Fluorescent-Polymerase Chain Reaction), las cuales descartan en apenas 24 horas la existencia de las cromosopatías más frecuentes como son el síndrome de Down, el síndrome de Patau, el síndrome de Edwards o las que implican a los cromosomas sexuales (Choolani y cols., 2007; Shaffer y cols., 2007).

La tendencia actual dentro del campo del diagnóstico prenatal está dirigida hacia la realización de diagnósticos cada vez más precoces y menos invasivos.

1.2. Diagnóstico prenatal genético no invasivo (DPNI)

La gran desventaja de las técnicas obstétricas invasivas es el riesgo de pérdida fetal y las posibles complicaciones obstétricas. Es precisamente este riesgo, el que lleva a algunas gestantes a evadir la realización de esta prueba aún cuando podría estar altamente recomendada. Estos inconvenientes son los que intenta solventar el Diagnóstico Prenatal (genético) No Invasivo (DPNI).

Aunque, como ya se ha descrito previamente, los métodos prenatales no invasivos clásicos agrupan la ecografía y el cribaje bioquímico, en adelante en el presente trabajo, el término *Diagnóstico Prenatal No Invasivo (DPNI)* se referirá al estudio genético del feto a partir de sangre materna (Figura 1.3). Este nuevo método de diagnóstico prenatal no conlleva ningún riesgo de pérdida fetal al realizarse a partir de una muestra de sangre periférica materna. Existen dos abordajes diferentes en el DPNI:

- ❖ El estudio de **células fetales** circulantes en sangre materna
- ❖ El estudio de **ADN fetal libre** circulante en plasma materno

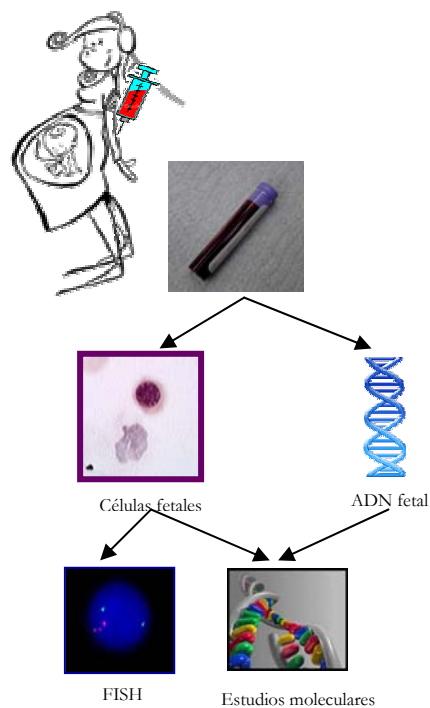


Figura 1.3. Posibles abordajes en el DPNI

1.2.1 Células fetales en sangre materna

En 1893 Schmorl describió la existencia de células procedentes del trofoblasto en los pulmones de gestantes que habían fallecido por eclampsia. Este descubrimiento no cobró especial importancia hasta que posteriores trabajos demostraron la presencia de células fetales circulantes en sangre de gestantes sanas (Kleihauer y cols., 1957; Clayton y cols., 1964; Grosset y cols., 1974). Fue años más tarde cuando se pensó que el estudio de estas células podría derivar en el desarrollo de un método de diagnóstico prenatal no invasivo. Se realizaron varios estudios para conocer los distintos tipos celulares fetales circulantes en sangre materna con el fin de seleccionar la estirpe más adecuada para realizar el análisis. De estos trabajos se concluyó que el eritroblasto, perteneciente a la línea hematopoyética, era el candidato más idóneo para posteriores estudios debido a sus características (Bianchi y cols., 1990, 1991).

En 1997, Bianchi y colaboradores determinaron la presencia de una única célula fetal por cada mililitro de sangre materna lo que derivó en la búsqueda de métodos de enriquecimiento de dichas células para su posterior análisis. Para ello, algunos de los métodos empleados fueron gradientes de densidad (Gänshirt-Ahlert y cols., 1992; Zheng y cols., 1993; Slunga-Tallberg y cols., 1995), citometría de flujo (Herzenberg y cols., 1979; Bianchi y cols., 1993) y selección mediante antígenos de membrana (Bianchi y cols. 1990; 1991; 1993; 1994; Gänshirt-Ahlert y cols., 1992, Zheng y cols. 1993; 1995). Tras el enriquecimiento, el estudio de las células recogidas se abordó de diversas maneras:

- ❖ Extensión de la fracción celular obtenida para su tinción y posterior estudio mediante técnica de FISH (Elias y cols., 1992; Zheng y cols., 1993; Bischoff y cols. 1995; de Graaf y cols., 1999) (Figura 1.4).
- ❖ Extracción del ADN de las células para su posterior análisis molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Bianchi y cols., 1990; Büsch y cols., 1994).
- ❖ Microdissección de células individuales para su posterior análisis molecular mediante la técnica de PCR (Takabayashi y cols., 1995; Sekizawa y cols., 1996) o PCR a Tiempo Real (Zhong XY y cols., 2006; 2007).

Estos métodos de enriquecimiento, aislamiento y análisis de las células fetales permitieron realizar diversos estudios prenatales como son la determinación del sexo fetal (Rodríguez de Alba y cols., 1999; Hromadnikova y cols., 2002a; Bianchi y cols., 2002), determinación de mosaicismos confinados a la placenta (Bischoff y cols. 1995; Rodríguez de Alba y cols., 2000), detección de diversas aneuploidías fetales (Eliás y cols., 1992; Rodríguez de Alba y cols., 1999, 2001; Bianchi y cols., 2002) y diagnóstico de enfermedades de herencia mendeliana (Saker y cols., 2006).

Recientes estudios han planteado la posibilidad de realizar un diagnóstico prenatal no invasivo de aneuploidías y complicaciones del embarazo a partir de la cuantificación de células nucleadas de la serie roja presentes en sangre materna. El aumento del número de estas células podría ser un marcador de diversas patologías como síndrome de Down y preeclampsia (Falcidia y cols., 2004; Hahn y cols., 2005; Krabchi y cols., 2006; Mavrou y cols., 2007).

En la actualidad el empleo de las células fetales en sangre materna ha pasado a un segundo plano dentro del diagnóstico prenatal no invasivo debido al descubrimiento del ADN fetal libre circulante en sangre materna. Las principales razones por las que cada vez se desestima más el uso de las células fetales para realizar un estudio prenatal no invasivo son:

- ❖ El escaso número de células fetales (1 equivalente genómico por mililitro de sangre materna) (Bianchi y cols., 1997).
- ❖ La metodología requerida para el estudio de las células fetales es muy compleja, tediosa y costosa.
- ❖ Se ha descrito que la cromatina en los eritroblastos fetales se compactan antes de que el núcleo sea expulsado de la célula haciendo que el análisis mediante la técnica de FISH no sea fiable (Babochkina y cols., 2005).
- ❖ Aproximadamente la mitad de los eritroblastos existentes en sangre materna son de origen materno, lo que dificulta el diagnóstico fetal (Troeger y cols., 1999).

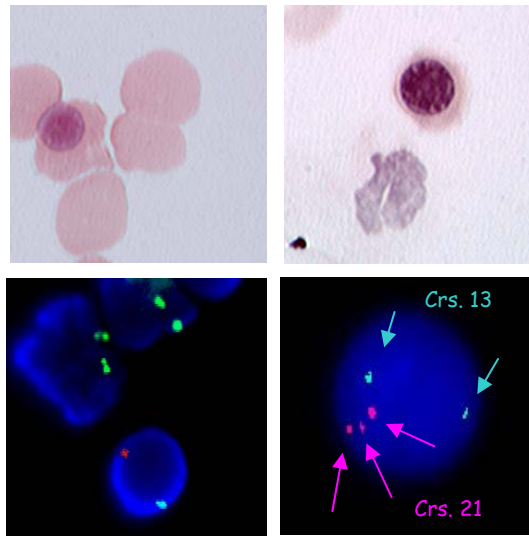


Figura 1.4. Eritroblastos fetales teñidos mediante el método Kleibauer y analizados mediante la técnica de FISH (Figura cedida por la Dra. Marta Rodríguez de Alba)

Así, aunque todavía existen algunos grupos trabajando en el estudio de las células fetales (Johnson y cols., 2007; Tjøa y cols., 2007; Borgatti y cols., 2008), la mayoría de estudios realizados en la actualidad en el campo del diagnóstico prenatal no invasivo se centran en el empleo del ADN fetal libre circulante en sangre materna (Hahn y Chitty., 2008; Hahn y cols., 2008; Norbury y Norbury., 2008; van der Schoot y cols., 2008).

1.2.2 ADN fetal libre circulante en sangre materna

1.2.2.1 Descubrimiento

La existencia de ADN libre circulante en el torrente sanguíneo fue descrita por primera vez por Mandel y Métais en 1948. Este descubrimiento fue destacado, pero no obtuvo gran reconocimiento hasta que posteriores estudios realizados en pacientes con enfermedades autoinmunes demostraron el incremento de ADN libre en el plasma de dichos pacientes (Ayala y cols., 1951). La potencial aplicación del descubrimiento de Mandel y Métais surgió en 1977 cuando se observó que los altos niveles de ADN libre en plasma de pacientes con cáncer disminuían con el tratamiento de radioterapia (Leon y cols., 1977). Años más tarde, mutaciones oncogénicas fueron detectadas en plasma o suero de pacientes con cáncer (Vasioukhin y cols., 1994) revelando que el ADN procedente de células oncogénicas podía aislarse a partir de plasma o suero de pacientes con cáncer.

Dada la gran similitud, como elemento invasivo, entre un tumor y el tejido placentario (Strickland y cols., 1992) y considerando los estudios previamente descritos en plasma de pacientes con cáncer, años más tarde, Lo y colaboradores plantearon y demostraron la existencia de ADN fetal libre circulante en el torrente sanguíneo materno (Lo y cols., 1997). Dicha confirmación se basó en la detección de secuencias específicas del cromosoma Y en plasma y suero de gestantes con un feto varón, obteniendo una sensibilidad de detección del 80% en plasma y 70% en suero. Este nuevo descubrimiento representó un gran avance dentro del campo del diagnóstico prenatal no invasivo debido a que la proporción de ADN fetal libre presente en plasma/suero de gestante era superior al número de las células fetales existentes en el torrente sanguíneo materno (Lo y cols., 1998).

El ADN fetal coexiste en el plasma/suero materno con ADN libre de origen materno. Pese a haberse demostrado cantidades similares de ADN fetal en ambas fracciones sanguíneas (Lo y cols., 1998) la diferencia en la sensibilidad a favor del plasma fue atribuida a la menor presencia de ADN materno, debido a la falta de coagulación (Lee y cols., 2001). Por ello el plasma materno ha sido la fracción elegida desde entonces para el estudio del ADN fetal.

1.2.2.2 Biología

Mediante el estudio de embarazos por fecundación asistida se ha demostrado que la edad gestacional más temprana a la que se detecta la presencia de ADN fetal en sangre materna es el día 18 tras la transferencia del embrión (Guibert y cols., 2003). A partir de este momento la presencia de ADN fetal en el plasma materno se hace más notable a medida que la gestación avanza (Lo y cols., 1998; Galbiati y cols., 2005) representando entorno al 3% (15.9 equivalentes genómicos) del ADN total presente en plasma materno en estadios tempranos de la gestación y un 6% (52 equivalentes genómicos) a término (Lo y cols., 1998; Angert y cols., 2003; Galbiati y cols., 2005) (Figura 1.5). Sin embargo, estos valores son muy fluctuantes entre las gestantes (Zhong y cols., 2000a; Hahn y cols., 2001).

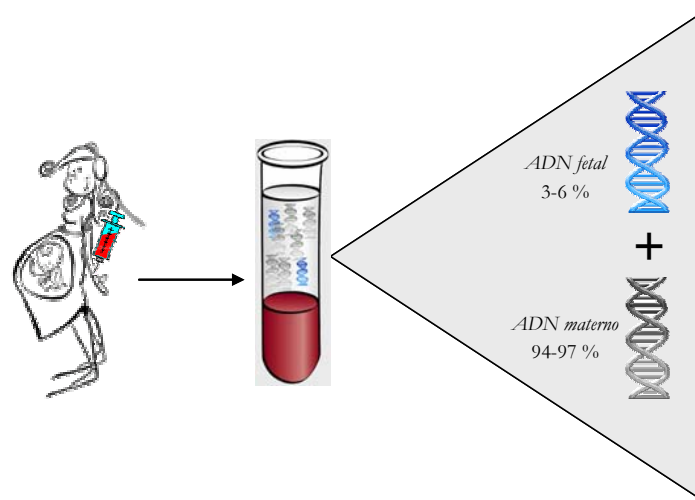


Figura 1.5. Porcentaje de ADN fetal en plasma materno

Varios grupos han descrito que el ADN fetal desaparece rápidamente del plasma materno tras el parto, presentando una vida media de menos de 20 minutos (Lo y cols., 1999a; Lau y cols., 2002; Ng y cols., 2003) (Figura 7). Sin embargo hay otros autores que demuestran la persistencia del ADN fetal días (Smid y cols., 2003), semanas (Hui y cols., 2008) e incluso décadas después del parto (Invernizzi y cols., 2002). Nuestra experiencia, basada en el estudio de 40 muestras de plasma materno recogidas a diferentes momentos posparto, es que el ADN fetal es detectable hasta 48 horas después del alumbramiento, desapareciendo tras este periodo de tiempo (datos de laboratorio).

En algunas situaciones patológicas se ha descrito el aumento de la cantidad de ADN fetal o total en plasma materno. Algunas de estas situaciones son:

- ❖ Preeclampsia o retraso en crecimiento intrauterino (Lo y cols., 1999b; Allaire y cols., 2000; Leung y cols., 2001; Zhong y cols., 2001; Swinkels y cols., 2002; Hahn y cols., 2005; Smid y cols., 2006).
- ❖ Trisomía 21 (Lo y cols., 1999c; Zhong y cols., 2000b; Jorgez y cols., 2007), aunque un estudio presenta datos contradictorios (Hromadnikova y cols., 2002b).
- ❖ Trisomía 13 (Zhong y cols., 2000b; Wataganara y cols., 2003).
- ❖ Polihidramnios (Zhong y cols., 2000c).
- ❖ Abortos espontáneos (Yin y cols., 2007) o parto pretérmino (Leung y cols., 1998; Farina y cols., 2005).
- ❖ Hiperemesis gravidarum (Sekizawa y cols., 2001).
- ❖ Embarazos con placenta invasiva (Sekizawa y cols., 2002).

Sin embargo, no se ha observado un aumento significativo de ADN fetal circulante en plasma materno en los casos de:

- ❖ embarazos por fecundación in vitro (Pan y cols., 2005).
- ❖ Fetos con trisomía 18 (Zhong y cols., 2000b; Wataganara y cols., 2003).
- ❖ Consumo de tabaco durante el embarazo (Lapaire y cols., 2007).

1.2.2.3 Origen trofoblástico

Se han postulado diversos mecanismos que podrían ser responsables de la presencia del ADN de origen fetal libre circulante en sangre materna.

Una de las primeras hipótesis sostenía que este ADN podía proceder de la apoptosis de las células hematopoyéticas fetales existentes en sangre materna. Esta idea surgió tras un estudio que reveló la existencia de marcadores apoptóticos en, aproximadamente, el 40% de las células fetales que se aislaron a partir de sangre

materna (Sekizawa y cols., 2000). Esta primera hipótesis fue sustentada por el hecho de que la apoptosis en sangre materna se acentúa con la edad gestacional y con la presencia de aneuploidías en el feto (Lo y cols., 1999c; Kolialexi y cols., 2001) fenómenos que justificarían el aumento de ADN fetal libre a lo largo de la gestación y en gestaciones de fetos con determinadas aneuploidías (Lo y cols., 1998; Galbiati y cols., 2005).

Sin embargo, el aumento de la concentración de ADN fetal extracelular descrito en plasma materno de gestantes con parto pretérmino (Leung y cols., 1998) no va asociado a un aumento en el número de células fetales (Hoesli y cols., 2002). Este hecho indicaría que los mecanismos responsables de la presencia de ADN fetal libre en sangre materna y de la liberación de células fetales al torrente sanguíneo materno son diferentes. Además, dado que la concentración de eritroblastos fetales es mucho menor que la de ADN fetal en sangre materna (Bianchi y cols., 1997; Lo y cols., 1998) esta hipótesis no explicaba la totalidad del ADN fetal circulante en plasma materno.

Una segunda hipótesis que se planteó, fue el origen placentario de este ADN fetal como resultado de la apoptosis de células trofoblásticas. Las células del trofoblasto recubren el espacio intervelloso que separa las vellosidades trofoblásticas y que alberga sangre materna. Estas células tienen un papel importante en el mantenimiento de la función placentaria. El ADN procedente de la apoptosis de estas células placentarias sería liberado al espacio intervelloso llegando a la circulación materna (Figura 1.6).

Varias evidencias que apoyan la placenta como la fuente predominante de ADN fetal en plasma materno son la existencia de ADN de células de la placenta en plasma materno en casos de anomalías cromosómicas confinadas a la placenta (Masuzaki y cols., 2004), la existencia de productos de transcripción de genes de expresión placentaria (Chim y cols., 2005) y la presencia de ADN fetal después de que la placenta se haya formado pero anterior a la formación del sistema circulatorio fetal (Guibert y cols., 2003).

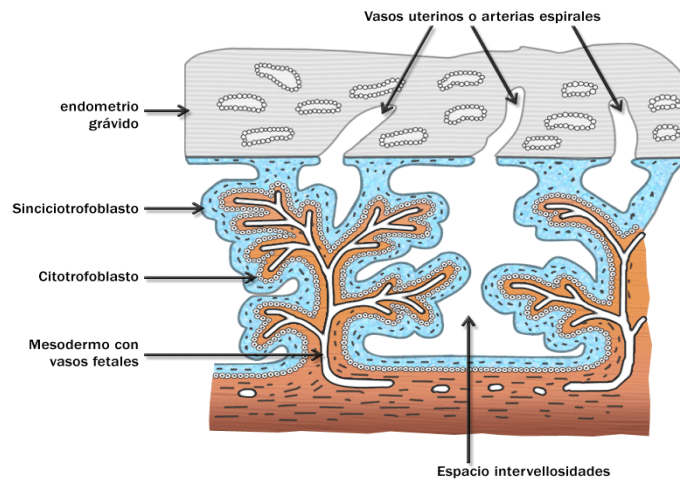


Figura 1.6. Dibujo esquemático del trofoblasto placentario

El origen a partir de la apoptosis trofoblástica explicaría el aumento de ADN fetal en plasma y suero a lo largo de la gestación (Lo y cols., 1998; Galbiati y cols., 2005) así como en gestaciones con preeclampsia (Lo y cols., 1999a; Allaire y cols., 2000; Leung y cols., 2001; Zhong y cols., 2001) y la rápida desaparición del ADN fetal tras el parto (Lo y cols., 1999b; Jonson-Hopson y Arlet, 2002; Lau y cols., 2002; Benachi y cols., 2003; Smid y cols., 2003; Rijnders y cols., 2004). En preeclampsia la insuficiente invasión de los trofoblastos externo-viliares parece estar relacionada con el daño hipóxico de los trofoblastos viliares, lo que induce la apoptosis de estos últimos (Loke y King., 1997).

Recientemente se ha confirmado el origen trofoblástico del ADN fetal a través de un estudio realizado en embarazos anembrionicos (embarazo anormal en el que hay una placenta intrauterina de primer trimestre pero no hay embrión) (Alberry y cols., 2007). En este trabajo se estudiaron 9 embarazos anembrionicos y 15 embarazos normales en el primer trimestre de gestación. Se observó que los niveles de ADN fetal eran similares en ambos grupos por lo que se concluyó que las células del trofoblasto parecen ser la fuente mayoritaria responsable de la presencia de ADN fetal en plasma materno.

Por lo tanto, hoy en día se acepta que la mayor parte del ADN fetal presente en sangre materna procede de la apoptosis de las células trofoblásticas, aunque también podría existir una contribución minoritaria procedente de la apoptosis de las células hematopoyéticas.

1.2.2.4 Enriquecimiento y aislamiento

Dada la baja proporción de ADN fetal en plasma materno y su coexistencia con ADN de origen materno, se han buscado diferentes métodos tanto para el enriquecimiento de dicho ADN como para su diferenciación frente al ADN de origen materno. Una de las primeras aproximaciones se basó en el descubrimiento del menor tamaño de los fragmentos de ADN fetal frente a los de origen materno (Chan y cols., 2004). Más del 99% del ADN fetal circulante en sangre materna tiene un tamaño inferior a los 313 pares de bases (pb) teniendo la mayoría una longitud de 145 pb como máximo, mientras que los fragmentos de ADN materno son significativamente de mayor longitud (Chan y cols., 2004; Li y cols., 2004; 2005). Esta diferencia en la longitud de los fragmentos de ADN de ambos orígenes (materno y fetal) se empleó para la separación y el enriquecimiento de las moléculas de ADN fetal mediante distintos métodos:

- ❖ En geles de agarosa: la separación de fragmentos se realiza en función del tamaño mediante una electroforesis y enriquecimiento de la muestra en ADN fetal mediante la recogida de los fragmentos de menor tamaño. Se ha descrito la detección de una mutación fetal heredada vía paterna asociada a β -talasemia mediante el enriquecimiento de la muestra por este método (Li y cols., 2005).
- ❖ Kits de columnas de purificación de ADN comerciales que retienen las moléculas de pequeño tamaño (Clausen y cols., 2007; Legler y cols., 2007).

Otro método de enriquecimiento que se propuso, aseguraba que la presencia de formaldehído en el tubo de recogida de la muestra de sangre materno aumentaba la proporción de ADN fetal al evitar la lisis de las células maternas y por tanto la liberación de ADN materno al plasma (Dhallan y cols., 2004). Estos autores aseguraban ser capaces de aumentar la proporción de ADN fetal hasta valores medios de 20-25% del total de ADN presente en la muestra. Sólo otro grupo de investigadores ha sido capaz de reproducir este método (Costa y cols., 2004) mientras que han sido varios los autores que no han tenido éxito en dicha reproducción (Chung y cols., 2005; Chinnapagari y cols., 2005; Datos de laboratorio).

Una vía alternativa para la diferenciación del ADN fetal frente al de origen materno, y actualmente en pleno desarrollo, es la posibilidad de utilizar las diferencias de metilación entre ambos ADNs para la identificación de secuencias específicas del feto (Poon y cols., 2002; Chan y cols., 2006; Tong y Lo., 2006a). Esta posibilidad ha llevado al descubrimiento de varias secuencias de ADN que se encuentran diferencialmente metiladas en el feto y en la madre y, por lo tanto, con un potencial para ser empleados como marcadores de ADN fetal (Chim y cols., 2005; Chan y cols., 2006; Old y cols., 2007).

Figura 1.7. Características principales del ADN fetal en plasma materno

- Origen trofoblástico
- Escasa concentración (3-6 %)
- Coexistencia con ADN libre de origen materno
- Fragmentado
- Aumenta a lo largo de la gestación
- Aumenta en gestaciones con determinadas patologías
- Desaparece tras el alumbramiento

1.2.2.5 Epigenética

Dado que el ADN fetal se encuentra enmascarado por la presencia mayoritaria de ADN libre materno, el diagnóstico prenatal no invasivo ha estado limitado al estudio de alelos o mutaciones fetales de herencia paterna o *de novo* que no se encuentren presentes en el genoma materno. La existencia de un marcador específico fetal solventaría esta limitación.

Recientemente la epigenética ha demostrado ser una herramienta útil en el DPNI. Los fundamentos moleculares de los procesos epigenéticos radican en la introducción de modificaciones químicas en las bases nucleotídicas o en determinados aminoácidos de las proteínas histónicas. Dichos cambios generan cambios en la configuración de la cromatina que la vuelven transcripcionalmente activa (citosinas de las regiones promotoras no metiladas e histonas acetiladas) o

inactiva (citosinas de las regiones promotoras metiladas). En mamíferos, existen diferencias significativas en los patrones de metilación entre los genomas paterno y materno. Además, existen unos patrones normales de metilación que varían durante las etapas del desarrollo. La diferencia existente en la metilación de algunos genes entre el genoma paterno y materno, así como en los tejidos derivados del trofoblasto, están siendo empleados por algunos autores como método de identificación del ADN de origen fetal en el plasma materno.

La primera evidencia del empleo de la epigenética como herramienta para la detección de ADN fetal en plasma materno fue publicada por Poon y cols en 2002, los cuales fueron capaces de distinguir el ADN fetal y el materno a partir de las diferencias de metilación en los genes *IGF2* y *H19*. El locus *IGF2-H19* presenta un estado de metilación diferente según el origen parental, encontrándose metilado en el alelo paterno y no metilado en el alelo materno. En dicho trabajo los autores se basaron en estas diferencias para estudiar el ADN fetal mediante la detección de secuencias metiladas. Más tarde otros autores, basándose en las diferencias de metilación en tejidos de origen placentario, estudiaron el gen *maspin* (*SERPINB5*), gen supresor de tumores expresado en la placenta (Chim y cols., 2005). Este gen está hipometilado en la placenta y casi completamente metilado en las células sanguíneas maternas. En dicho trabajo los autores describían la detección de secuencias hipometiladas de dicho gen, y por tanto de origen fetal, en plasma materno. Por ello propusieron que secuencias hipometiladas de este gen (*SERPINB5*) podrían emplearse como un marcador universal para ADN fetal en plasma materno.

Sin embargo, todas estas secuencias propuestas como posibles marcadores fetales se encuentran hipometiladas frente al ADN materno lo que requiere para su análisis de una conversión con bisulfito, técnica muy laboriosa y en la que se pierden, durante el manejo, grandes cantidades de ADN tratado. Por ello en la actualidad se están buscando marcadores fetales epigenéticos que se encuentren hipermetilados frente al ADN materno, de forma que el tratamiento con bisulfito sea sustituido por el empleo de enzimas de restricción específicas de zonas metiladas. Con este objetivo ha sido recientemente descrito el promotor *RASSF1A*, localizado en el cromosoma 3, el cual está preferencialmente hipermetilado en el

ADN fetal e hipometilado en el ADN materno (Chan y cols., 2006; Chiu y cols., 2007; Tsui y cols., 2007).

Otras secuencias, localizadas en el cromosoma 21 y metiladas de forma diferente en sangre periférica y en placenta, se han identificado como posibles candidatos para el diagnóstico prenatal del síndrome de Down (Old y cols., 2007; Chim y cols., 2008).

1.2.3 ARN fetal en sangre materna

Años después del descubrimiento de la presencia de ADN fetal en sangre materna se demostró la existencia de ARN fetal (Poon y cols., 2000; 2001). Dada la alta labilidad de este ácido nucleico, el descubrimiento de su presencia en plasma materno fue sorprendente. Esta observación sugirió que probablemente este ARN estaba protegido por algún mecanismo. Halicka y colaboradores demostraron que las células podrían liberar ADN y ARN en cuerpos apoptóticos separados durante la apoptosis (Halicka y cols., 2000). Hasselmann y colaboradores testaron esta hipótesis mediante el desarrollo de un modelo *in vitro* en el que investigaron la estabilidad del ARNm de la tirosinasa incluida en cuerpos apoptóticos (Hasselmann y cols., 2001). Los resultados obtenidos en este estudio mostraron la estabilidad de este ARNm en suero, incluso ante la presencia de nucleasas. Otra evidencia empírica de la hipótesis de la posible inclusión del ARN en cuerpos apoptóticos fue demostrada mediante un experimento en el que muestras de plasma eran filtradas a través de poros de diferente diámetro (Ng y cols., 2002). Los resultados de este trabajo sugirieron que la mayoría de las especies de ARNm existen asociadas a una partícula, probablemente en forma de cuerpos apoptóticos.

Desde su descubrimiento en plasma materno, diversos estudios han descrito la detección de diferentes moléculas de ARN de origen placentario, apoyando la hipótesis que propone a la placenta como principal fuente de ácidos nucleicos fetales en sangre materna (Ng y cols., 2003; Oudejans y cols., 2003; Go y cols., 2004; Tsui y cols., 2004). También varios autores han descrito el análisis de ARNm específicos del cromosoma 21 y asociados a la placenta como medio de detección de aneuploidías fetales (Oudejans y cols., 2003; Lo y cols., 2007a).

Al igual que ocurre con el ADN fetal, se han observado diversas patologías del embarazo asociadas al aumento de determinados ARNm de la placenta como el aumento de la hormona liberadora de Corticotropina en embarazos con preeclampsia (Ng y cols., 2003) y ARNm procedente del β -polipéptido de Gonadotropina Coriónica en embarazos con enfermedad trofoblástica (Masuzaki y cols., 2005).

1.2.4 Aplicación Clínica del DPNI

El objetivo del diagnóstico prenatal en sangre materna es el estudio genético del feto sin implicar ningún riesgo de pérdida fetal ni riesgo para la gestante. Una de las mayores limitaciones de este diagnóstico es que, dado la presencia de ADN materno en la fracción de plasma y la imposibilidad de separarlo del ADN de origen fetal, este diagnóstico está limitado actualmente al estudio de secuencias fetales heredadas del padre o mutaciones *de novo* y ausentes en el genoma materno (Figura 1.8). A pesar de esta limitación, son diversos los estudios prenatales que se han realizado a partir del análisis de ADN fetal en plasma materno.

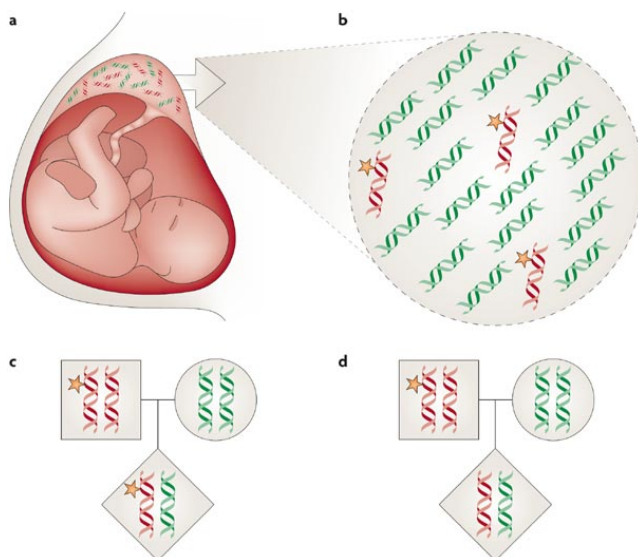


Figura 1.8. Principios del análisis del ADN fetal circulante en plasma materno. **a.** Liberación de ADN fetal al torrente sanguíneo materno a través de la placenta. Previo a la liberación, las moléculas de ADN fetal (rojo) y ADN materno (verde) se encuentran en la misma proporción. **b.** En el plasma materno las moléculas de ADN fetal se encuentran en mucha menor proporción que el ADN materno. Alelos fetales específicos de origen paterno (estrella), que no están presentes en el ADN materno, son las secuencias más fácilmente detectables. Por ejemplo secuencias del cromosoma Y, secuencias del gen RbD en gestantes Rb negativas y mutaciones o polimorfismos heredados vía paterna. **c,d** Se puede realizar un diagnóstico prenatal no invasivo a partir de la detección de dichas secuencias fetales de origen paterno. Mediante la detección de la mutación fetal de herencia paterna (**c**) o alternativamente, se podría realizar el diagnóstico prenatal de enfermedades recesivas mediante la exclusión de la mutación paterna en los casos en los que el padre y la madre del feto son portadores de diferentes mutaciones (**d**). (Lo y cols., Nature Reviews 2007)

1.2.4.1 Diagnóstico del sexo fetal

Uno de los primeros diagnósticos derivados del descubrimiento de la presencia de ADN fetal en sangre materna fue la determinación del sexo fetal a partir del análisis de secuencias específicas del cromosoma Y. El conocimiento del sexo fetal en estadios tempranos de la gestación es un dato relevante en embarazos con riesgo de alguna enfermedad ligada al sexo como son, entre otras, la distrofia muscular de Duchenne, hemofilia, distrofia muscular de Becker, hiperplasia adrenal congénita, enfermedad de Norrie, retinosquiasis y retinosis pigmentaria ligada al X. Esta prueba evitaría el diagnóstico prenatal convencional en aquellos casos en los que se descartase el sexo fetal asociado a la enfermedad (Figura 1.9). Mediante la determinación del sexo fetal en sangre materna se puede suprimir el diagnóstico prenatal convencional en el 50% de estas gestaciones, lo que implicaría la supresión del riesgo de pérdida fetal asociado a las técnicas obstétricas invasivas. Hasta la fecha únicamente se ha descrito la incorporación de este diagnóstico a la práctica clínica en dos países: Inglaterra y España (Hyett y cols., 2005; Bustamante-Aragones y cols., 2008c; Finning y cols., 2008a).

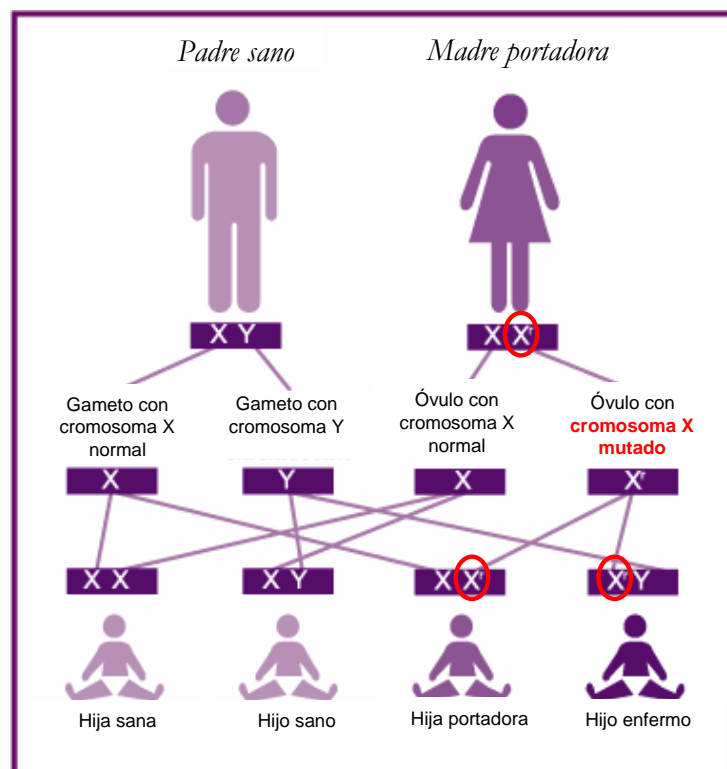


Figura 1.9. Esquema de herencia de enfermedades ligadas al cromosoma X.

1.2.4.2 Diagnóstico del factor Rh fetal

La enfermedad hemolítica o eritroblastosis fetal es una enfermedad fetal y neonatal causada por una incompatibilidad sanguínea materno-fetal, habitualmente debida al factor Rh. Se caracteriza por el paso transplacentario de anticuerpos maternos IgG contra antígenos del hematíe fetal, produciendo hemólisis, anemia fetal, hidropesía fetal e incluso muerte del feto (Figura 1.10). La inmunoprofilaxis de dicha enfermedad se realiza mediante la administración, como tratamiento preventivo, de una inmunoglobulina D (anti-D), en el tercer trimestre de gestación, a todas las gestantes Rh negativas. Dado que sólo existe riesgo de isoimmunización cuando el feto es Rh positivo y dado que el factor Rh fetal se conoce tras el nacimiento, actualmente se administra la vacuna innecesariamente hasta en un 38% de los casos.

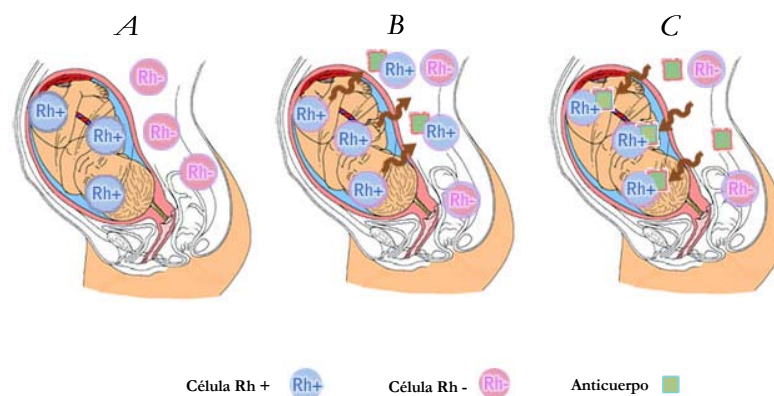


Figura 1.10. Aloimmunización materna en gestantes Rh negativo **A.** Incompatibilidad feto-materna en el factor Rh debido a la presencia de un feto Rh+. **B.** La exposición a células sanguíneas fetales Rh+ activa la producción de anticuerpos maternos anti-RhD. El primer embarazo con aloimmunización no suele tener problemas. **C.** En embarazos posteriores, la existencia de anticuerpos anti-RhD pueden producir anemia en el feto e incluso la enfermedad hemolítica fetal.

La determinación del Rh fetal en plasma materno de gestantes Rh negativas ayuda al correcto y más exhaustivo seguimiento de aquellas gestaciones diagnosticadas con un feto Rh positivo, así como a la supresión del tratamiento con inmunoglobulina en los casos de fetos Rh negativos (Gautier y cols., 2005; Finning y cols, 2008b; van der Schoot y cols., 2008). Esto repercute en una mejora del tratamiento en embarazos con riesgo de la enfermedad hemolítica, en un ahorro económico en el sector sanitario y en la eliminación del riesgo de infecciones, como

la hepatitis C, que se producen a través de las inmunoglobulinas. El diagnóstico del RhD fetal a partir del estudio de ADN fetal en plasma materno ya ha sido incorporado en la práctica clínica de algunos países como Francia, Bélgica e Inglaterra (Finning y cols., 2002; Gautier y cols., 2005; Minon y cols., 2008).

1.2.4.3 Diagnóstico de enfermedades monogénicas

Mediante el análisis de ADN fetal presente en sangre materna se han estudiado, hasta el momento, diversas enfermedades de herencia mendeliana empleando diferentes técnicas de análisis (Tabla 1.1). Dada la existencia de ADN de origen materno en la muestra de plasma, estos estudios se han limitado a la detección de defectos congénitos de herencia paterna o *de novo*.

Enfermedad	Técnica empleada	Referencia bibliográfica
<i>Acondroplasia</i>	Análisis de Restricción MALDI-TOF MS	Saito y cols., 2000; Li y cols., 2004 Li y cols., 2007
<i>Beta-talasemia</i>	PCR a Tiempo Real Espectrometría de masas PNA-Clamp PCR	Chiu y cols., 2002b Ding y cols., 2004 Li y cols., 2005
<i>Hiperplasia adrenal congénita</i>	PCR fluorescente-SNPs	Chiu y cols., 2002a
<i>Corea de Huntington</i>	QF-PCR	Gonzalez-Gonzalez y cols., 2003a;2003b <i>Bustamante-Aragones y cols., 2008d</i>
<i>Fibrosis Quística</i>	Análisis de restricción Minisequenciación	Gonzalez-Gonzalez y cols., 2002 <i>Bustamante-Aragones y cols., 2008a</i>
<i>Hb Lepore</i>	PCR Standard específica de alelos	Lazaros y cols., 2006
<i>Distrofia Miotónica</i>	PCR anidada	Amicucci y cols., 2000
<i>Distrofias de Retina</i>	Secuenciación automática dHPLC	<i>Bustamante-Aragones y cols., 2006</i> <i>Bustamante-Aragones y cols., 2008e</i>
<i>Acidemia propiónica</i>	Minisequenciación	<i>Bustamante-Aragones y cols., 2008b</i>

Tabla 1.1. Enfermedades monogénicas estudiadas a partir de ADN fetal en plasma materno.
(Modificación sobre la tabala publicada por Norbury y cols., 2008)

1.2.4.4 Diagnóstico de aneuploidías

Uno de los grandes objetivos del DPNI es la posibilidad de diagnosticar aneuploidías fetales tales como el síndrome de Down (trisomía 21), síndrome de Patau (trisomía 13), síndrome de Edwards (trisomía 18) o aneuploidías de los cromosomas sexuales como son, entre otros, el síndrome de Turner (monosomía del X) o el síndrome de Klinefelter (varones XXY). La coexistencia del ADN fetal y ADN de origen materno, junto con el hecho de que la mayoría de las aneuploidías son de origen materno, ha dificultado la distinción entre cromosomas fetales y maternos lo que ha representado durante mucho tiempo un gran obstáculo.

Una estrategia que se está desarrollando actualmente para solventar esta limitación ha sido la cuantificación de secuencias específicas del feto y su posterior comparación frente a secuencias de origen materno. Para ello se han empleado ARNm expresados en placenta o SNPs localizados en los cromosomas responsables de la aneuploidía a estudiar. Los diferentes estudios que hasta la fecha se han realizado son:

- ❖ Estudio del *ratio* alélico de SNPs fetales de herencia paterna localizados en el cromosoma implicado en la aneuploidía a estudiar (Tsui y cols., 2005; Dhallan y cols., 2007). Cuando ambos progenitores son homocigotos para diferentes variantes de un SNP, el ADN fetal presente en el plasma materno será heterocigoto para dicho SNP. La variante de origen paterna es un marcador del ADN fetal. Si se estudia un SNP que cumpla estos requisitos localizado en el cromosoma 21 y otro localizado en un autosoma diferente, la cuantificación de las dos variantes de cada SNP (variante materna y variante fetal de origen paterno) permitiría la identificación del número de cromosomas 21 fetales. Para este diagnóstico es indispensable la búsqueda de un SNP para el que ambos progenitores sean homocigotos de una variante diferente, lo que limita el estudio.
- ❖ Estudio del *ratio* alélico de ARNm expresados en placenta y específicos del cromosoma implicado en la aneuploidía (Oudejans y cols., 2003; Lo y cols., 2007a; 2007b).
- ❖ Estudio del *ratio* alélico de marcadores epigenéticos (Tong y cols., 2006b).

A través de estos métodos de análisis basados en la comparación de *ratios* alélicos de SNPs o ARNm específicos del feto se ha conseguido determinar trisomía 21 (síndrome de Down) y trisomía 18 (síndrome de Edwards). Sin embargo estas metodologías se encuentran todavía en una fase temprana de experimentación y requieren técnicas muy sofisticadas y de complicado manejo lo que las sitúa, por el momento, bastante alejadas de su aplicación clínica.

1.2.5 Investigación traslacional en el DPNI

El diagnóstico prenatal no invasivo es ya una realidad dentro de las consultas de diagnóstico prenatal dado que algunos de los diagnósticos derivados del estudio de ADN fetal libre en plasma materno han sido trasladados a la práctica clínica. Este es el caso de la determinación del factor Rh y del sexo fetal.

El diagnóstico del sexo fetal en gestaciones con riesgo de alguna enfermedad ligada al sexo fue la primera aplicación clínica que surgió tras el descubrimiento de ADN fetal libre en plasma materno. Actualmente este diagnóstico está disponible en algunos centros de Inglaterra y de España (Hyett y cols., 2005; Bustamante-Aragones y cols., 2008c; Finning y cols., 2008a).

Otro diagnóstico prenatal derivado del estudio de ADN fetal en plasma materno ha sido la determinación del Rh fetal en plasma de gestantes Rh negativo. Este diagnóstico se ha incorporado a la rutina clínica de algunos centros en Francia, Bélgica e Inglaterra (Finning y cols., 2002; Gautier y cols., 2005; Minon y cols., 2008).

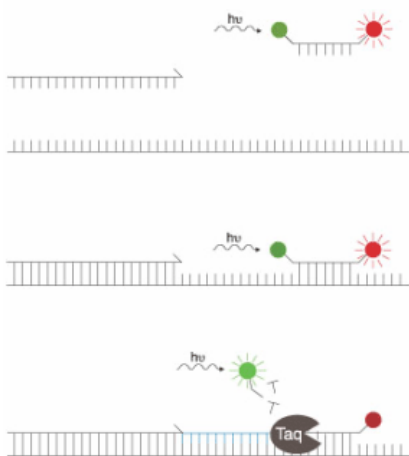
1.3 Aportaciones del presente trabajo al DPNI

1.3.1 Introducción de nuevas tecnologías en el DPNI

1.3.1.1 Antecedentes

Dada la escasez de ADN fetal en la muestra de plasma materno, su estudio requiere técnicas analíticas muy sensibles. Una de las primeras y más empleadas técnicas destinadas a este fin, debido a su gran sensibilidad de detección, ha sido la PCR a Tiempo Real (Lo y cols., 1998; Guibert y cols., 2003; Galbiati y cols., 2005; Zhong y cols., 2006). Esta técnica, basada en la reacción convencional de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR), incorpora el empleo de fluorocromos lo que se traduce en un aumento en la sensibilidad de detección. Existen, principalmente, dos químicas diferentes en la PCR a Tiempo Real: 1) sondas de secuencia complementaria a una región del fragmento a amplificar y las cuales llevan unido un fluorocromo, normalmente, en su extremo 5'. La incorporación de este tercer cebador en la reacción aumenta la especificidad de la técnica frente a la PCR convencional; 2) agente o molécula intercalante que emite fluorescencia cuando se encuentra entre la doble hebra de ADN (Figura 1.11). En ambos casos la fluorescencia emitida es recogida, a tiempo real, por un detector fluorogénico que lleva incorporado el termociclador.

a) Sondas



b) Agente intercalante

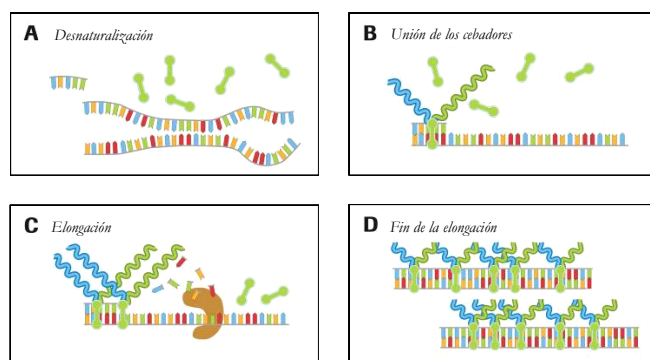


Figura 1.11. Diferentes métodos de PCR a Tiempo Real

Esta técnica es la que se utiliza actualmente en los dos diagnósticos prenatales basados en el estudio del ADN fetal en plasma materno: determinación del sexo y Rh fetal (Finning y cols., 2002; Gautier y cols., 2005; Hyett y cols., 2005; Bustamante-Aragones y cols., 2008c; Finning y cols., 2008a; Minon y cols., 2008). En el presente trabajo se ha utilizado esta técnica para la determinación del sexo fetal (mediante el uso de sondas) y para el estudio de una mutación fetal asociada a una enfermedad metabólica (mediante un agente intercalante de reciente aparición).

Dado que el campo de la biología molecular avanza vertiginosamente, cada vez son más las técnicas analíticas disponibles en el mercado. La aparición de nuevos métodos de análisis suele ir asociado a un aumento en la sensibilidad de detección permitiendo el estudio de cantidades mínimas de ADN. La aparición de tecnologías cada vez más sensibles abre nuevas posibilidades de detección dentro del DPNI. Sin embargo, la aplicación clínica, que representa el fin último de estos estudios, requiere técnicas apropiadas para dicho uso. Por ello se necesitan técnicas fiables, de manipulación sencilla, que permitan una rápida obtención de resultados y de bajo coste.

En este trabajo se presenta el estudio del ADN fetal en plasma materno mediante el empleo de PCR a Tiempo Real y otras técnicas de diagnóstico molecular aún no descritas en el campo del diagnóstico prenatal no invasivo. La finalidad de incorporar nuevas técnicas diagnósticas al análisis del ADN fetal es la posibilidad de desarrollar nuevos estudios prenatales no invasivos.

Otra técnica empleada en este trabajo ha sido la secuenciación automática. Esta técnica permite conocer la secuencia de bases nitrogenadas de un determinado fragmento de ADN permitiendo detectar los posibles cambios existentes. Se basa en una reacción de amplificación que incorpora un porcentaje de didesoxinucleótidos (ddNTP). Los ddNTPs, a diferencia de los dinucleótidos (dNTPs), carecen del grupo OH en el carbono 3' de la desoxirribosa lo que impide la unión de posteriores nucleótidos. La incorporación de un ddNTP paraliza la elongación de la cadena. Los productos de la reacción de secuenciación son analizados en un secuenciador automático mediante electroforesis capilar. Cada uno de los 4 ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) está unido a un fluorocromo diferente. Los

fluorocromos son excitados por un haz de luz emitiendo energía en diferentes longitudes de onda que son recogidas por una cámara CCD. Como resultado se genera un electroferograma, una sucesión de picos que representa la secuencia de bases nitrogenadas del fragmento de ADN estudiado (Figura 1.12).

Esta técnica se utiliza de forma rutinaria en los laboratorios de diagnóstico genético, pero en DPNI sólo existía una evidencia de su uso para el estudio de ADN fetal en plasma materno (Poon y cols., 2002). En el presente trabajo se muestra el estudio de una mutación fetal asociada a retinosis pigmentaria ligada al X (apartado 4.5).

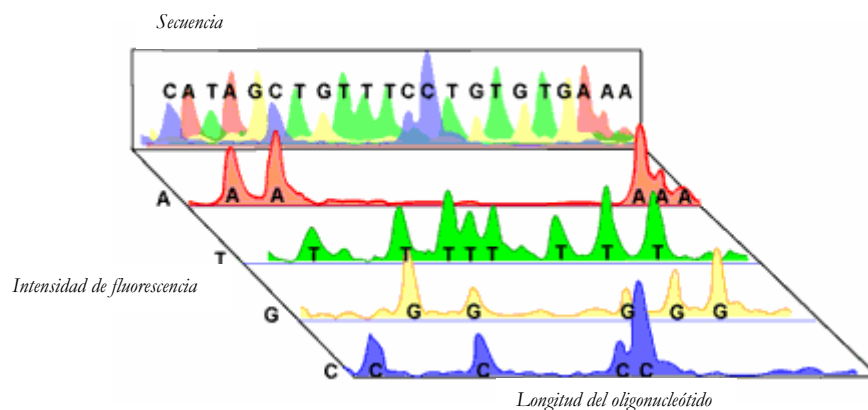


Figura 1.12. Ejemplo de electroferograma en el que se muestra como los diferentes fragmentos de ADN generados durante la reacción de secuenciación permiten conocer la base nitrogenada existente en cada una de las posiciones del fragmento a estudiar.

1.3.1.2 Nuevas técnicas analíticas en DPNI

Se presenta el empleo de tres técnicas, no descritas previamente en el estudio del ADN fetal en plasma materno, para el estudio de mutaciones fetales de origen paterno. Dichos métodos han sido: dHPLC (*denaturing High Performing Liquid Chromatography*), técnica de minisequenciación y una nueva química intercalante de PCR a Tiempo Real, *High Resolution Melting (HRM)*.

1.3.1.2.1 Técnica de dHPLC

La técnica de dHPLC (*denaturing High Performing Liquid Chromatography*) es una cromatografía líquida desnaturante de alta resolución. Requiere una amplificación previa mediante PCR del fragmento a estudiar. Esta técnica de análisis consiste en la desnaturación y posterior renaturalización del producto de PCR. Durante la renaturalización las secuencias que son complementarias hibridan perfectamente formando los llamados homodúplex. Sin embargo, el apareamiento erróneo entre secuencias que difieren en alguna posición debido a un polimorfismo o a una mutación, forman los llamados heterodúplex. La técnica de dHPLC revela la presencia de mutaciones y polimorfismos basándose en la detección de las formas heterodúplex (Figura 1.13). En el presente trabajo se muestra el estudio de una mutación fetal asociada a una retinopatía mediante este método (apartado 4.2).

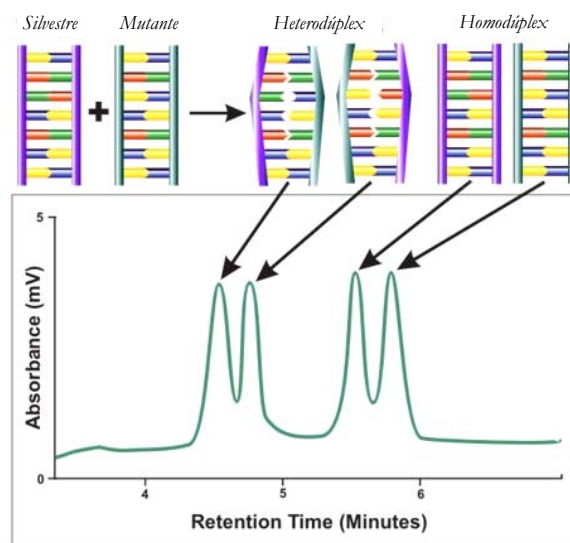


Figura 1.13. Técnica de dHPLC. Patrón teórico generado por cada producto renaturalizado.

1.3.1.2.2 Técnica de minisequenciación

La técnica de minisequenciación o *single base primer extension method* es una técnica similar a la secuenciación automática. Difiere de ésta en que únicamente se estudia una base, en vez de toda la secuencia del amplicón. Por ello, se requiere el diseño de un cebador (o sonda) que hibride en su extremo 5' con la base anterior a la posición de interés (Figura 1.14). Al contrario que en la reacción de secuenciación, en esta técnica sólo se incluyen didesoxinucleótidos (ddNTP), de forma que la elongación es de un único nucleótido el cual es complementario a la base de interés. Dado que cada uno de los cuatro ddNTPs lleva unido un fluorocromo diferente, el color del producto de amplificado obtenido en el electroferograma indica el genotipo de la muestra en la posición estudiada. En este trabajo se presenta el empleo de esta técnica para el estudio de tres mutaciones fetales asociadas a fibrosis quística y una mutación asociada a acidemia propiónica (ver apartado 4.3 y 4.4).

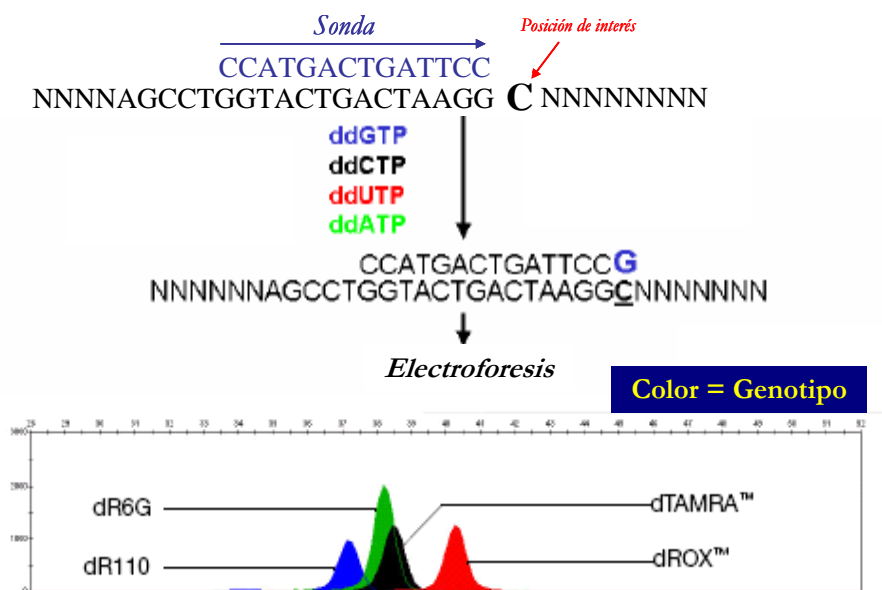


Figura 1.14. Técnica de minisequenciación. Cada ddNTP está marcado con un fluorocromo diferente. El único ddNTP incorporado a la sonda en la reacción indica el nucleótido presente en la posición de interés.

1.3.1.2.3 Técnica de HRM

La molécula clásica intercalante utilizada en PCR a Tiempo Real ha sido el *SybrGreen* (Figura 1.11). Esta química permitía realizar estudios de cuantificación así como detectar la existencia de amplificadores inespecíficos o dímeros de los cebadores. La técnica de *High Resolution Melting* (HRM) emplea una nueva química intercalante para PCR a Tiempo Real (R27 en el caso de Roche Diagnostics) que tiene la característica de ser saturante. Esta nueva característica permite que, además de los análisis que ya proporcionaba la química del *SyBrGreen*, se pueda realizar el genotipado de las muestras estudiadas. A diferencia del *SyBrGreen*, la técnica de HRM no se basa en el cálculo de la temperatura de *melting* sino en las diferencias en el patrón de *melting* de los productos de PCR (Figura 1.15). De esta manera es posible diferenciar amplificadores con cambios hasta en única base nitrogenada. En el presente trabajo se presenta el estudio de una mutación fetal asociada a acidemia propiónica mediante esta nueva química (ver apartado 4.4).

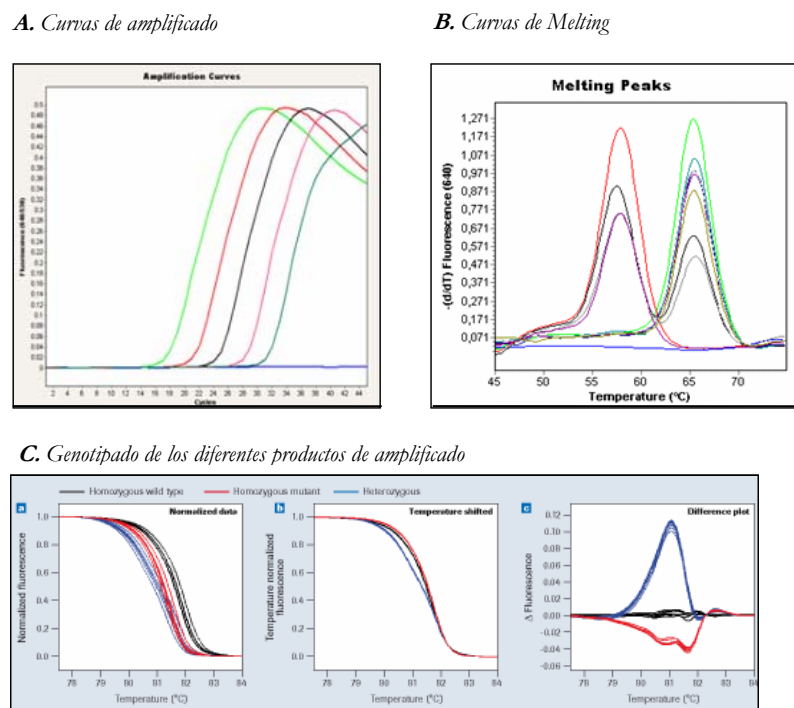


Figura 1.15. Diferentes análisis generados en la técnica de *High Resolution Melting*. **A** y **B**: Curvas de amplificación y de *melting* obtenidas tanto por la química clásica de *SyBrGreen* como la nueva química de HRM. **C**: Genotipado de los productos de PCR basado en la comparación de los patrones de *melting*. El genotipado de las muestras es la nueva aplicación que permite la técnica de HRM.

1.3.2 Estudio de enfermedades monogénicas

Como se ha citado anteriormente, el DPNI en sangre materna se encuentra limitado, en la actualidad, al estudio de mutaciones *de novo* o de herencia paterna no portadas por la gestante. Mediante el estudio de la mutación de origen paterno en el plasma materno se puede realizar un diagnóstico prenatal de una determinada enfermedad. En el caso de enfermedades de herencia dominante, este diagnóstico sería decisivo para determinar si el feto porta o no la enfermedad. En el caso de enfermedades de herencia recesiva, sólo en los casos en los que la mutación de herencia paterna fuese detectada en el plasma materno sería necesaria una posterior biopsia corial o líquido amniótico para confirmar la condición de afecto o portador del feto para la enfermedad de estudio.

En este trabajo se han estudiado mutaciones fetales asociadas a diferentes enfermedades con un patrón de herencia dominante (corea de Huntington), recesivo (fibrosis quística, amaurosis congénita de Leber y acidemia propiónica) y ligada al X (retinosis pigmentaria ligada al X).

1.3.2.1 Enfermedades de herencia dominante

1.3.2.1.1 Corea de Huntington

El corea de Huntington (CH; OMIM 143100) es una enfermedad neurodegenerativa de carácter progresivo que incluye tanto síntomas físicos como psiquiátricos y que actualmente es incurable. Su prevalencia es de 4-10/100000 habitantes en países occidentales. Presenta un patrón de herencia dominante y está asociada a la expansión de una región polimórfica formada por repeticiones del triplete CAG localizado en el exon 1 del gen *IT15*. Esta región de repeticiones se traduce en un tracto de poliglutamina y la expansión de esta región da como resultado la formación de inclusiones neuronales intranucleares. El rango de repeticiones del triplete oscila entre 9 a 37 en individuos sanos y de 37 a 86 en enfermos de CH (Rubinsztein D, 2002).

En el presente estudio se determinó la presencia/ausencia del alelo expandido de herencia paterna en el plasma materno de cuatro gestantes con riesgo de portar un feto enfermo de corea de Huntington. Al tratarse de una enfermedad de herencia dominante, el correcto diagnóstico de la mutación paterna en el plasma materno evitaría la necesidad de un diagnóstico prenatal invasivo (Bustamante-Aragones y cols., 2008d).

1.3.2.2 Enfermedades de herencia recesiva

1.3.2.2.1 Amaurosis congénita de Leber

La amaurosis congénita de Leber (LCA) es una alteración primaria de los fotorreceptores que se presenta de forma congénita o antes del primer año de vida debido a una pérdida grave tanto de bastones como de conos en toda la retina desde el nacimiento. La LCA es una enfermedad extraordinariamente heterogénea, tanto clínica como genéticamente. Supone cerca del 5% de los casos de distrofia retiniana y entre el 10-18% de los casos de ceguera congénita (Kaplan y cols., 1990). Su incidencia es de 2-3 casos por cada 100.000 nacidos vivos. En la mayor parte de los casos, la herencia es autosómica recesiva. Hasta el momento se han descrito 11 genes y 2 loci responsables de LCA (RetNet). Todos estos genes se expresan preferentemente en la retina o el epitelio pigmentario de la retina.

En este trabajo se presenta la determinación del carácter portador de un feto para la mutación paterna asociada a LCA mediante el estudio de plasma materno.

1.3.2.2.2 Fibrosis quística

La fibrosis quística (FQ; OMIM 219700) también conocida como mucoviscidosis, se trata de una enfermedad multisistémica que presenta implicación pulmonar, digestiva y del aparato reproductor. Constituye la principal causa de enfermedad crónica grave en la infancia y es la responsable de la mayor parte de las insuficiencias pancreáticas exocrinas en las primeras etapas de la vida. La FQ

presenta un patrón de herencia recesivo y está asociada a mutaciones en el gen CFTR (gen regulador de la conductancia transmembránica) el cual codifica para una proteína de la membrana celular que actúa como canal o bomba aniónica. La proteína codificada por este gen es un canal de cloro y su disfunción genera alteraciones hidro-electrolíticas en las secreciones de las glándulas de los órganos donde se asienta. Hasta la fecha se han identificado más de 620 mutaciones diferentes en este gen, responsables de la gran variabilidad clínica de la enfermedad. La mutación más frecuente es la $\Delta F508$ (p.Phe508del), presente en el 66% de los alelos mutados, aunque su frecuencia varía mucho entre los diferentes grupos étnicos (Bobadilla y cols., 2002; Farez-Vidal y cols., 2004). En la población española esta mutación se encuentra en un 53% de los pacientes de FQ. El resto de las mutaciones están en frecuencia muy bajas dentro de la población.

Este trabajo presenta el estudio de tres gestaciones con riesgo de portar un feto enfermo de fibrosis quística mediante el análisis de presencia/ausencia de la mutación paterna en el plasma materno (Bustamante-Aragones y cols., 2008a).

1.3.2.2.3 Acidemia propiónica

La acidemia propiónica (AP; OMIM 606054) es una de las enfermedades metabólicas más frecuentes, con una incidencia poblacional de un caso por cada 50000 nacidos vivos (Desviat y cols., 2004). Es una enfermedad muy heterogénea clínicamente, pero en la mayoría de los pacientes tiene un debut clínico neonatal asociado con retraso en el crecimiento y muerte temprana. Tiene una herencia autosómica recesiva y está causada por mutaciones en los genes *PCCA* y *PCCB* los cuales codifican para la enzima propionil-coenzima A carboxilasa (Desviat y cols., 2004). Mutaciones en estos genes causan una deficiencia de la enzima produciéndose una alteración en el catabolismo de los aminoácidos. Es una enfermedad muy heterogénea genéticamente, al igual que la mayoría de las enfermedades metabólicas hereditarias. Sin embargo la mutación c.1218del14ins12 es la más frecuente en población española habiéndose encontrado en el 31% de los alelos de los pacientes con AP (Rodríguez-Pombo y cols., 1998).

En el presente trabajo se muestra el estudio prenatal de un feto con riesgo de padecer acidemia propiónica mediante el análisis de la presencia/ausencia de la mutación portada por el padre (c.1218del14ins12) en el plasma materno (Bustamante-Aragones y cols., 2008b).

1.3.2.3 Enfermedades ligadas al cromosoma X

1.3.2.3.1 Retinosis pigmentaria ligada al cromosoma X

La retinosis pigmentaria (RP) es una enfermedad degenerativa de la retina caracterizada por ceguera nocturna y reducción del campo visual. Actualmente esta enfermedad abarca un grupo heterogéneo, tanto clínica como genéticamente, de degeneraciones retinianas que afecta a 1 de cada 4000 personas, lo que supone alrededor de 1,5 millones de pacientes en el mundo y 15000 pacientes en España (Ayuso y cols., 1995). Las formas de RP ligadas al cromosoma X (XLRP; MIM 312600) son las menos frecuentes, suponen entre un 6% y un 17% de todos los casos de RP, pero constituyen el tipo más severo debido a su temprano desarrollo y a su rápida progresión. Los varones afectados suelen presentar los primeros síntomas en la primera década de vida y entorno a los cuarenta o cincuenta años de vida, la enfermedad está tan avanzada que suelen ser considerados ciegos legales. Hasta el momento han sido mapeados cinco loci de XLRP: RP23, RP6, RP3, RP2 y RP24, pero sólo dos genes han sido identificados: *RPGR* (en el locus RP3) y *RP2*, asociados a la mayoría de las XLRP, al 70-90 % y al 10-20 % respectivamente (Musarella y cols., 1990).

Este trabajo muestra el estudio de un feto con riesgo de XLRP mediante el análisis de la mutación asociada a la enfermedad en plasma materno (Bustamante-Aragones y cols., 2006).

1.3.3 Introducción a la práctica clínica de la determinación del sexo fetal

Como se ha descrito anteriormente (apartado 1.2.4.1) la determinación del sexo fetal es un dato relevante en gestaciones con riesgo de una enfermedad ligada al sexo. En el presente trabajo se muestra el estudio de validación y la incorporación a la práctica clínica de la determinación del sexo fetal en plasma materno en el primer trimestre de gestación (Bustamante-Aragones y cols., 2008c). Es una de las primeras evidencias de la incorporación a la clínica del DPNI en España. Este diagnóstico se ofrece actualmente en nuestro hospital a partir de la séptima semana de gestación a todas aquellas gestantes que portan un feto con riesgo de padecer alguna enfermedad ligada al sexo. La precocidad con la que se realiza la prueba deja margen suficiente para poder realizar un posterior diagnóstico prenatal convencional en los casos en los que fuese necesario debido a que el sexo fetal diagnosticado fuese el asociado a la enfermedad.

1.4 Estado actual del DPNI en la práctica clínica

El DPNI es actualmente una realidad dentro del diagnóstico genético y, aunque hasta la fecha han sido únicamente dos los estudios trasladados a la clínica (determinación del sexo y Rh fetal), en un futuro próximo podría representar una herramienta imprescindible en toda unidad de genética reproductiva.

2. OBJETIVOS

2. AIMS OF THE WORK

2.1 Objetivo general

Optimizar el estudio del ADN fetal presente en plasma materno para la realización de un posterior diagnóstico prenatal no invasivo.

Optimization of the study of fetal DNA in maternal plasma to perform a subsequent non-invasive prenatal diagnosis.

2.2 Objetivos concretos

1. Incorporar nuevas técnicas moleculares al estudio de mutaciones fetales de origen paterno en plasma materno.

Incorporation of new molecular techniques for the study of paternally inherited fetal mutations in maternal plasma.

2. Determinar el abordaje más eficaz para el estudio de un determinado defecto genético fetal en ADN fetal circulante en plasma materno.

Assessment of the most accurate strategy for the study of a specific fetal genetic disorder in maternal plasma.

3. Ampliar el número de casos analizados de enfermedades previamente estudiadas en DPNI con el fin de apoyar la validez del método.

To increase the number of cases analyzed for diseases previously studied in NIPD, in order to support the method's validity.

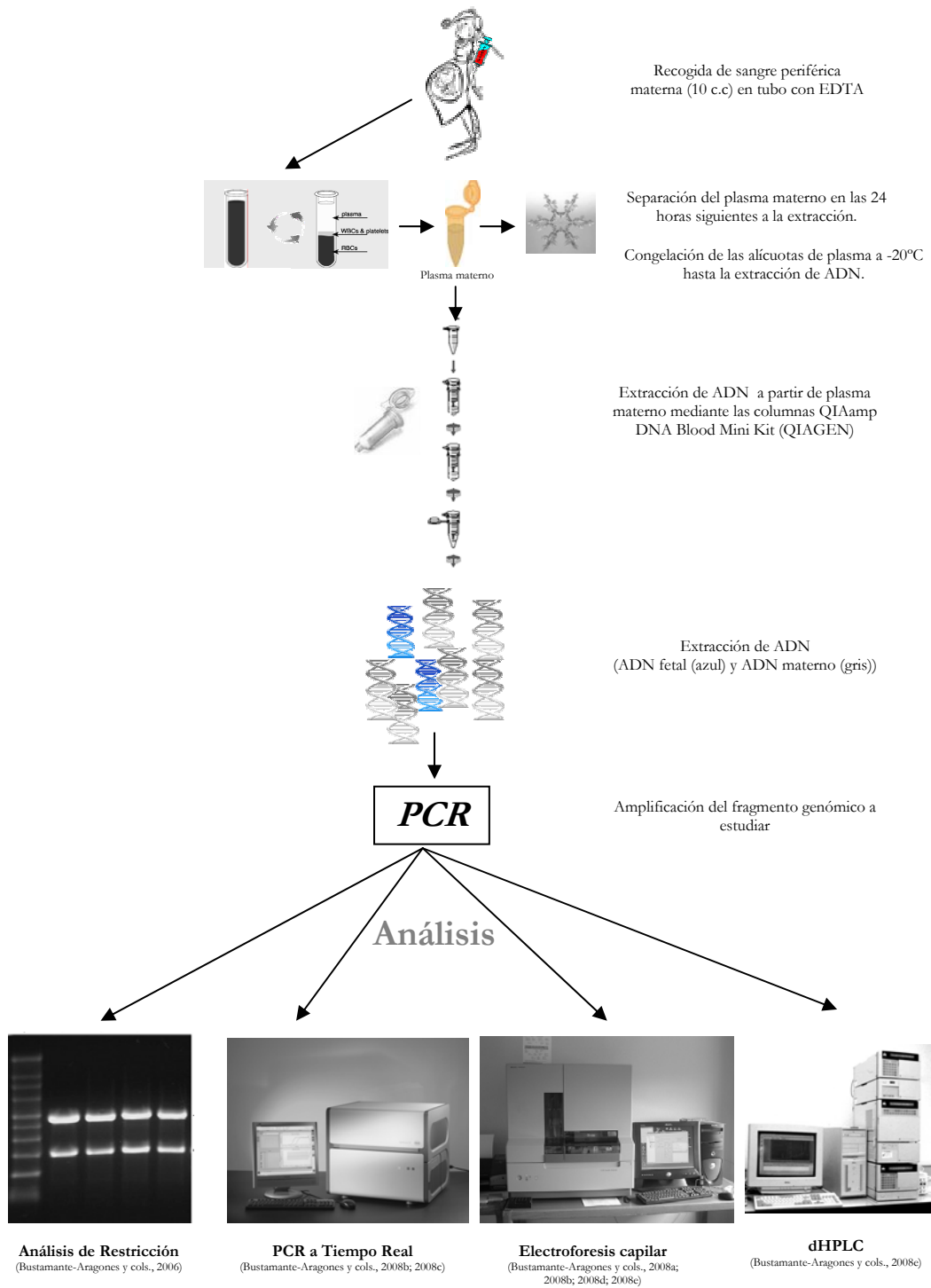
4. Validar el método de determinación del sexo fetal en sangre materna en el primer trimestre de gestación para su posterior introducción a la práctica clínica.

Validation of the fetal sex assessment in maternal plasma in the first trimester of gestation for its incorporation into the clinical practice.

3. METODOLOGÍA GENERAL

3. GENERAL METHODOLOGY

ESQUEMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA SEGUIDA



4. RESULTADOS

4. RESULTS

4.1 Diagnóstico prenatal en plasma materno de la enfermedad de Huntington: estudio directo e indirecto

Ana Bustamante-Aragonés, María José Trujillo-Tiebas, Jesús Gallego-Merlo, Marta Rodríguez de Alba, Cristina González-González, Diego Cantalapiedra, Carmen Ayuso, Carmen Ramos

European Journal of Neurology (2008) (Pendiente de aceptación)

La presencia de ADN fetal en plasma materno podría utilizarse para el diagnóstico prenatal no invasivo de corea de Huntington (CH). En este trabajo se presenta la determinación del estatus afecto o no afecto de fetos con riesgo para la enfermedad de Huntington, mediante el estudio de los alelos paternos en plasma materno.

Se ha estudiado plasma materno del primer trimestre de gestación recogido de cuatro gestaciones en las que el padre del feto estaba enfermo de CH. El status del feto para la enfermedad se determinó mediante un análisis directo del número de repeticiones CAG y un análisis indirecto mediante el marcador I1CAHD-S.

Se diagnosticaron correctamente 3 de los 4 fetos mediante el análisis directo. El análisis indirecto fue concluyente en un sólo caso.

Este trabajo demuestra la posibilidad de realizar un diagnóstico prenatal no invasivo de CH en plasma materno. Se ha detectado un alelo fetal expandido a la temprana edad gestacional de 6 semanas. El análisis directo de las repeticiones CAG ha mostrado mayor eficacia que el método indirecto en el diagnóstico de fetos con riesgo de padecer CH. Este diagnóstico no invasivo es aplicable únicamente a aquellos casos en los que el riesgo de la enfermedad tiene un origen paterno. Sin embargo, según la experiencia recogida como centro de referencia para el estudio de CH, esta situación representa el 80% de los embarazos en riesgo, lo que hace que este método tenga un alto valor diagnóstico para el estudio prenatal de CH. Además también sería una metodología útil para la confirmación de los embriones sanos transferidos en estudios preimplantacionales de CH.

Prenatal diagnosis of Huntington disease in maternal plasma: direct and indirect study

A. Bustamante-Aragones, MJ Trujillo-Tiebas, J. Gallego-Merlo, M. Rodriguez de Alba, C. Gonzalez-Gonzalez, D. Cantalapiedra, C. Ayuso, C. Ramos.

Department of Genetics, Fundacion Jimenez Diaz, Avda. Reyes Catolicos, 2, 28040, Madrid, Spain. Phone: +34 91 550 48 72. Fax number: +34 91 544 87 35. e-mail address: abustamante@fjd.es

ABSTRACT:

Background: The presence of cell-free fetal DNA in maternal plasma could allow performing a non-invasive prenatal diagnosis of Huntington disease. The great advantage of this diagnosis is the absence of risk of fetal loss that it entails.

Methods: Maternal plasma from four pregnant women in their first trimester of gestation with a fetus at-risk was studied. In all the four cases the father was affected.

Results: The diagnosis was performed both by a direct study of the mutation and an indirect haplotype study. By the direct analysis three out of the four fetuses could be correctly diagnosed while the indirect analysis was only conclusive in one case.

Discussion: Non-invasive prenatal diagnosis of Huntington disease is possible by the analysis of fetal DNA in maternal plasma. Direct analysis of the mutation has shown higher accuracy than the haplotype analysis except for long expansions. Haplotype analysis would need to be improved for the study of Juvenile-onset Huntington disease. This diagnostic method would be limited to those couples with an affected male however this situation represents 80-90 % of the pregnancies at-risk of HD. Moreover it could be used as a confirmation test of healthy embryos transferred on preimplantation genetic studies of HD.

INTRODUCTION:

Huntington Disease (HD) (OMIM 143100) is an autosomal dominant, progressive neurodegenerative disorder that presents with motor symptoms, cognitive deterioration and psychiatric symptoms. Physical symptoms occur in a large range of ages with a mean occurrence in the late forties/early fifties. It is caused by expansion of a polymorphic (CAG)_n trinucleotide repeat in exon 1 of the *IT15* gene. These repeats are translated into a polyglutamine tract and the expansion of this tract results in the formation of neuronal intranuclear inclusions containing huntingtin and ubiquitin [1]. The range of these repeats is up to 27 in normal individuals. Alleles with a range of repeats comprised between 27-35 are meiotically unstable; from 36-39 repeats are associated to the disease but with incomplete penetrance and with more than 40 repeats show a complete penetrance.

Since it is an incurable disease, pregnant women from families affected with HD may require a prenatal diagnosis in the first trimester of gestation to subsequently consider the therapeutic abortion when the fetus is affected. However this diagnosis requires a chorion villus sampling (CVS) which entails a risk of fetal loss (1-2%). Hence, healthy fetuses could be lost because of the invasive obstetric procedure.

In 1997, the presence of circulating cell free fetal DNA (ccffDNA) in maternal blood was firstly described [2]. This discovery opened up the possibility to develop a non-invasive prenatal diagnosis (NIPD) based on the analysis of maternal blood. The great advantage of this NIPD is the absence of fetal loss that it implies. It has been reported that this ccffDNA rises along gestation representing around 3 to 6% of the total DNA in early and late gestational ages respectively [3-4] and it is rapidly cleared after delivery [5-6].

Since the presence of this ccffDNA was reported, posterior studies have been focussed in performing different non-invasive prenatal diagnoses: fetal sex determination [7-8], fetal RH determination [9-11], fetal genetic diseases [12-15] and fetal aneuploidies [16-17]. At present, NIPD has been incorporated into the clinical practice only for fetal gender assesment in the first trimester of gestation [18] and for fetal RH determination [9-10]. Remaining studies in the NIPD field continue being in research stage but in a near future they could also be incorporated into the clinical practice [19].

To the best of our knowledge only two previous studies of our group have reported the analysis in maternal blood of two fetuses at risk of HD [20-21]. At present this diagnosis based on the analysis of maternal blood would be limited to those pregnancies in which the father of the fetus is affected with HD because of the presence of maternal DNA in the maternal plasma.

In the present work we have studied maternal plasma samples collected from four pregnancies at risk of having a fetus affected with HD. The aim of this study was to determine the status of the fetus for the HD by the study of the paternal

alleles present in the maternal plasma. For the analysis two methodologies recommended by EMQN to perform the diagnosis of HD have been used, one which targets the CAG repeat (direct analysis) and another one using a polymorphic microsatellite located in exon 1 of the *IT5* gene for an indirect study.

MATERIAL AND METHODS:

As a reference service, patients are directed to our department for genetic counselling and diagnosis of HD. All the studies are done following the recommendations established by EMQN. Four pregnant women who came for a chorion biopsy because they were at risk of having a fetus affected with HD were included in this study. In all cases the father of the fetus was affected with HD. (Figure 1)

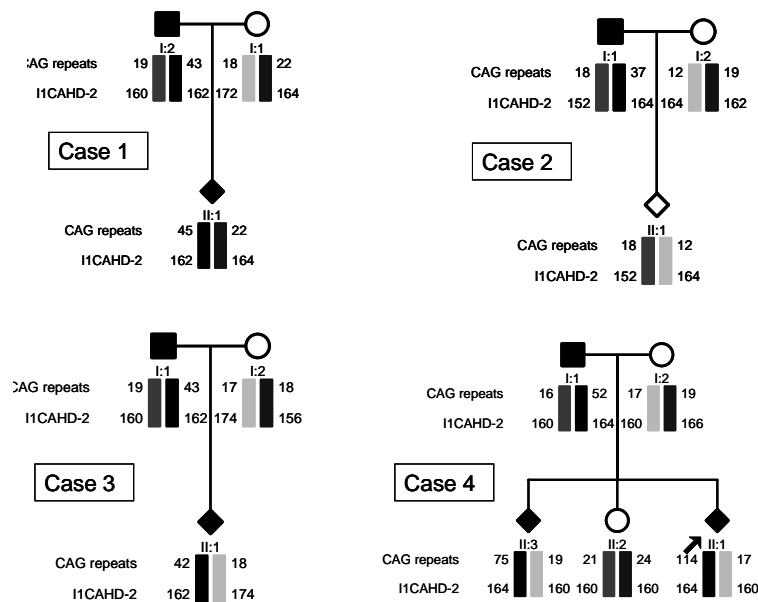


Figure 1: Familial genealogies. Haplotypes for the number of CAG repeats and I1CAHD-2 microsatellite alleles are shown.

Ten millilitres of peripheral blood were collected in EDTA tubes from each pregnant woman before CVS was performed (12 weeks). In Case 3 an earlier maternal blood sample was also taken at 6 weeks of gestation. Sample collection was performed under informed consent and in accordance with the Helsinki Declaration. Sample processing and DNA extraction was performed as previously described. [12]

In all four cases paternal DNA was used as positive control and maternal DNA as negative control. Control DNAs were extracted from 350 µl of peripheral blood by the BioRobot EZ1 using the DNA Blood protocol (QIAGEN, Hilden, Germany).

Haplotype for the CAG repeats and the polymorphic microsatellite were performed using the following procedures:

PCR amplification for the direct analysis (CAG repeats):

Direct analysis was performed by amplification of a fragment of the *IT-15* gene containing the polymorphic trinucleotide repeat (CAG) region. For the PCR amplification reaction 12.2 µl of DNA from plasma sample and 80 ng of DNA from the controls were used. Quantitative Fluorescent PCR (QF-PCR) was performed in a final volume of 20.5 µl containing 2 µl of PCR reaction buffer 10X with 20 mM MgCl₂ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 0.2 mM of each dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2 µl of dimethylsulphoxide (DMSO, Merck), 1 U of FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 5 pmol of the forward primer (ATGGCGACCCTGGAAAAGCTGATGAA) and 5 pmol of the reverse primer (NED-GGCGGTGGCGGCTGTTGCTGC) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Thermal cycling was initiated with a first denaturation phase at 94°C for 5 min followed by 1 min at 65°C and 1 min at 72°, and then 45 cycles of 94°C for 45 s and 65°C for 40 sec, followed by a final extension of 5 min at 74°C. Amplification was carried out in a GeneAmp PCR System 2700 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ten µl of PCR product from the plasma samples were electrophoresed in an ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and analyzed with the GeneMapper software package v 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Conversion of the amplicon peak size to a number of (CAG) repeats was performed using the following formula: Number of codon CAG = [amplicon size (bp) – 68] / 3.

PCR amplification for the indirect analysis:

A dinucleotide polymorphic microsatellite (I1CAHD-2) placed in exon 1 of the *IT15* gene and referred as the closest and the most informative marker of this gene (23) was used for PCR amplification. The PCR reaction was performed with 9.3 µl of DNA from plasma sample and 100 ng of DNA from controls. The final volume of the reaction was 15 µl containing 1.5 µl of PCR reaction buffer 10X with 20 mM MgCl₂ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 0.4 mM of each dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 U of FastStart Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 2.5 pmol of forward primer (VIC-TATGCCACTACTACAACCTGGGC) and reverse primer (ACCAGCATGTGGTATTGTCAAAGTG). Thermal cycling was carried out with a first denaturation phase of 12 min at 94° followed by 10 cycles of 94° for 15 sec, 55° for 15 sec and 72° for 30 sec, followed by 30 cycles of 89° for 15 sec, 55° for 15 sec and 72° for 30 sec. A final extension of 30 min at 72°C was carried out. Amplification was carried out in a Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ten µl of PCR product from the plasma samples were electrophoresed in an ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied

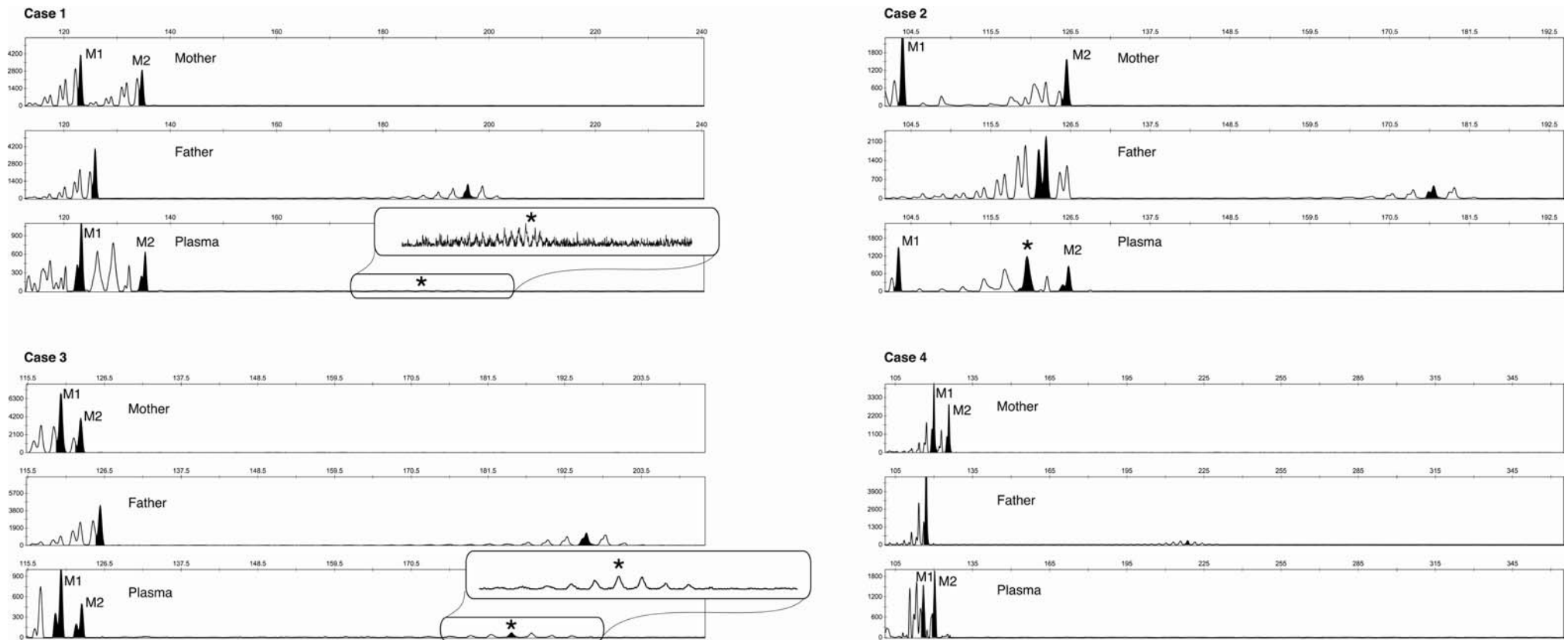


Figure 2: Electropherograms obtained in the direct analysis of the CAG repeats in the parental DNAs and the maternal plasma sample. M: maternal alleles (M₁: allele 1; M₂: allele 2); *: Paternally inherited fetal allele. Cases 1 and 3: A fetal expanded allele is observed. Case 2: A fetal normal allele is shown. Case 4: None paternal allele is observed.

Biosystems, Foster City, CA, USA) and analyzed with the GeneMapper software package (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

RESULTS:

In the electropherogram showed by the maternal plasma samples, the maternal alleles were observed in all four cases because of the existence of maternal DNA in the sample.

Direct analysis:

In the direct analysis the number of CAG repeats was studied. In the maternal plasma samples collected from cases 1, 2 and 3 in addition to the maternal alleles a paternal allele was observed, the expanded allele in cases 1 and 3 and the normal allele in Case 2. In the plasma sample from Case 4 neither the expanded nor the normal paternal allele was detected. (Figure 2)

Analysis of the chorion biopsies revealed that fetuses from Cases 1, 3 and 4 were affected of HD. In Case 4 it was observed that the number of repeats of the CAG triplet had extremely increased in the fetus compared to those observed in the father. Only the fetus from Case 2 was unaffected. (Figure 1)

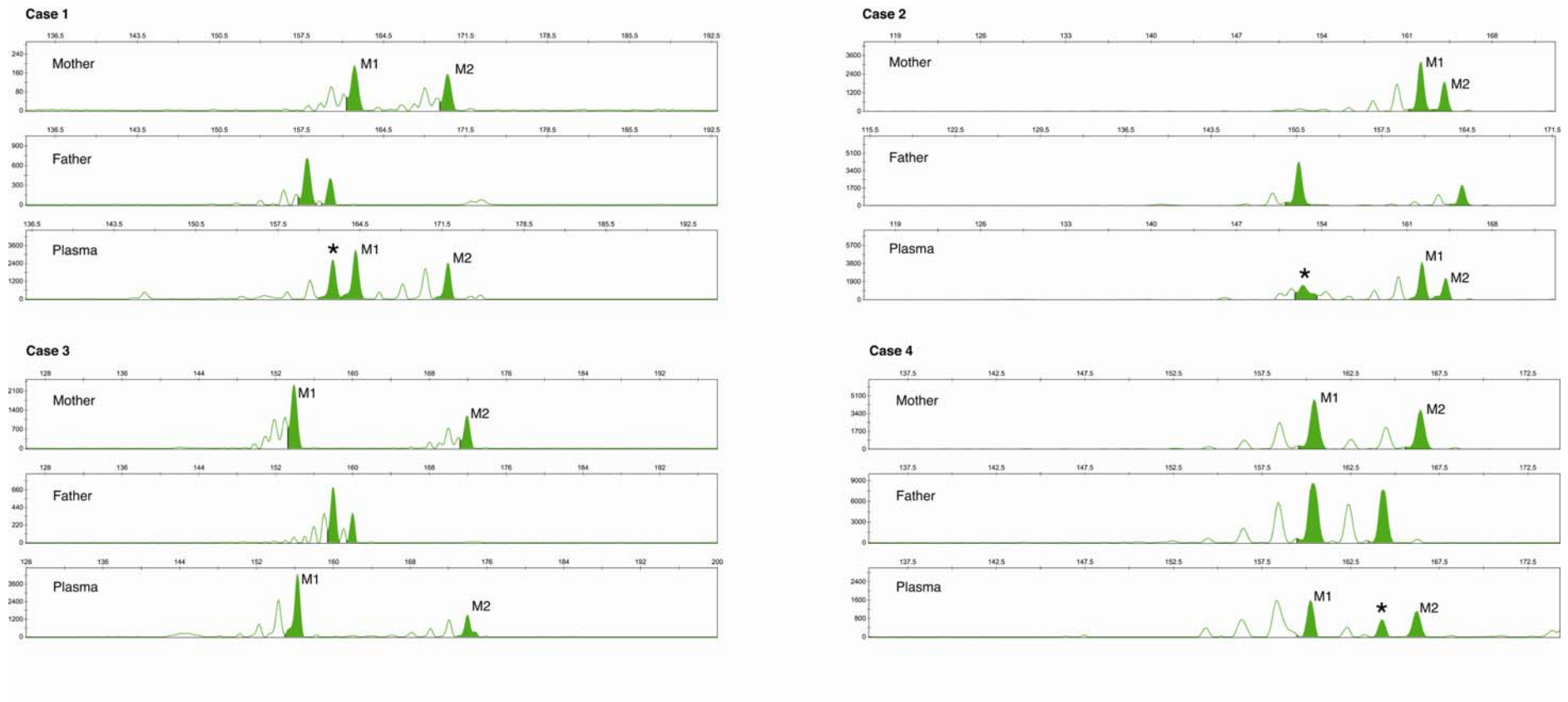
Comparing the results obtained from the analysis of the CAG triplet in the plasma samples and in the chorion biopsies, the diagnosis of Cases 1, 2 and 3 was correctly made in maternal plasma. However a misdiagnosis occurred in Case 4 since none of the paternal alleles were detected in maternal plasma.

Indirect Analysis:

This analysis was performed using the I1CAHD-S polymorphic microsatellite. Previous analysis of the control DNAs (paternal DNAs) and chorion biopsies revealed in each pregnancy the paternal haplotype associated to the disease (Figure 1).

In case 2 the paternal allele non-associated to the disease was clearly observed in the maternal plasma sample. However, in the plasma samples collected from cases 1, 3 and 4 the indirect study was inconclusive because the size of the paternal allele overlapped with the statter bands of the maternal alleles (cases 1 and 4) or because none of the paternal alleles were observed (Case 3). (Figure 3)

Therefore by the indirect analysis performed in maternal plasma only one fetus could be diagnosed.



*Figure 3: Electropherograms obtained in the indirect analysis for the 11CAHD-2 microsatellite in the parental DNAs and the maternal plasma sample. M: maternal alleles (M₁: allele 1; M₂: allele 2); * Paternally inherited fetal allele.*

DISCUSSION:

Huntington disease (HD) is a late-onset inherited neurodegenerative syndrome. In at-risk families with a reproductive project, prenatal diagnosis or a preimplantation genetic diagnosis with selective uterine transfer of unaffected embryos can be offered [22].

Current prenatal diagnosis requires undergoing invasive obstetric procedures, CVS, which entail a risk of fetal loss. The aim of the non-invasive prenatal diagnosis based on the analysis of cfDNA present in maternal blood is to perform a genetic study of the fetus without implying a risk for the fetus or the mother.

Non invasive prenatal diagnosis of HD in maternal blood would be a great advantage for those families affected with this disease. To the best of our knowledge there are only two previous publications made by our group which have reported this type of diagnosis showing promising results [20-21]. At present the impossibility to eliminate the presence of maternal DNA in the maternal plasma sample would limit the diagnosis to those cases in which the father of the fetus is affected with the disease. However, this would not represent a great disadvantage for this disease since, in our experience as a reference laboratory for diagnosis of HD, the 80-90% of the prenatal cases are referred because of an affected male (personal data).

In this work, maternal plasma samples from four pregnant women at risk of having a fetus affected with HD were studied. A direct analysis for the polymorphic trinucleotide repeat region and an indirect analysis using a dinucleotide polymorphic marker were carried out.

By the direct analysis the presence of an expanded allele in the maternal plasma could only be explained by its fetal origin since all four pregnant women were not affected of HD. Direct analysis of the CAG repeats in the maternal plasma samples was conclusive in three out of the four cases (Case 1, 2 and 3) in which the paternal allele was detected. In cases 1 and 3 the presence of expanded paternal allele in the maternal plasma sample revealed the affected condition of those fetuses. In case 3 the detection of the expanded paternal allele was evident even in the sample collected at the early stage of 6 weeks of gestation. In the plasma sample collected from Case 2 the paternal allele observed was the one with a normal range of repeats showing the unaffected condition of the fetus for the disease. These results were confirmed by the analysis of the polymorphic trinucleotide repeat (CAG) region in the chorion biopsies.

In one case (case 4) the direct method was inconclusive because neither the healthy nor the mutated paternal allele was observed in the plasma sample. However the analysis of the chorion biopsy of this fetus revealed an expansion of 114 repeats. The family of case 4 had two previous pregnancies: one with a fetus with 75 repeats and another one with a healthy fetus. In the third pregnancy, presented in this work, the fetus showed an expansion of 114 repeats. The father showed an expansion of 54 repeats, so the number of repeats in the expanded allele has increased considerably on their descendents along time. This phenomenon could be associated with an increase of the repeats in the paternal spermatozoa. Since it has

been reported that the size of the fragments of fetal DNA circulating in the maternal blood is less than 300-500 pb [23-24], the non-detection of the paternal allele in case 4 could be due to the high length of the fragment. The absence of fetal DNA was not considered because, based on our previous studies, we have come to accept the presence of fetal DNA from the 7th week of gestation [18].

The indirect analysis also performed allowed us to ascertain the status of the fetus only in the maternal plasma sample from case 2, in which the paternal allele associated to the healthy haplotype was observed. The I1CAHD-2 microsatellite has been reported to be the most informative and closest marker for the *IT15* gene [22] and it is currently used for indirect analysis in preimplantation studies, prenatal diagnosis and predictive testing of HD. However, in three out of four cases presented the fetal alleles were hidden by the maternal statter bands. This artefact can be explained by the low percentage of fetal DNA in the maternal blood [3-4]. Hence, this marker was not informative enough for this type of study because its dinucleotide condition. Future studies need to be done using a different marker, preferably not dinucleotide, in order to improve the indirect analysis in the maternal plasma.

Considering the results of this work, the direct method has shown to be more accurate than the indirect method using the I1CAHD-2 microsatellite. Anyhow, it seems to show a limitation for the detection of long expansions (case 4) which are associated to the infrequent Juvenile-onset Huntington disease [25]. However the frequency of the Juvenile form is low, it is responsible of 7% of the HD cases. As mentioned before, the reason for this limitation is probably associated to the small size of the cffDNA fragments [23-24]. For the study of these cases, the indirect study would be an alternative strategy; therefore the improvement of the indirect method with new markers would be crucial.

This work shows the successful non-invasive prenatal diagnosis of HD as early as the 6th week of gestation. Early results obtained by the analysis of cffDNA in maternal plasma would allow undergoing conventional prenatal diagnosis in case it would be required. However, future studies with the analysis of larger size series of samples are required. In addition to the non-invasive prenatal diagnosis of fetuses at risk of HD, this method could also be used for the confirmation of the healthy status of the embryos transferred in preimplantation genetic studies.

Acknowledgements: We would like to thank to the patients for collaborating in these research studies. This work has been supported by the CIBERER and Ministry of Health (PI040218). Ana Bustamante is supported by Fundacion Conchita Rabago de Jimenez Diaz.

REFERENCES:

1. Rubinsztein D. Draft best practice guidelines for molecular analysis of Huntington disease. EMQN 2002
2. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350:485-7
3. Lo YM, Tein MS, Lau TK *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
4. Galbiati S, Smid M, Gambini D *et al.* Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum Genet* 2005; 117(2-3):243-8
5. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 218–24.
6. Ng EK, Tsui NB, Lau TK *et al.* mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(8):4748-53.
- 7 Ho SS, Damayanti Z, Chua WY *et al.* Non-invasive prenatal diagnosis of fetal gender using real-time polymerase chain reaction amplification of SRY in maternal plasma. *Ann Acad Med Singapore* 2004; 33(5 Suppl):S61-2
- 8 Johnson KL, Dukes KA, Vidaver J *et al.* Interlaboratory comparison of fetal male DNA detection from common maternal plasma samples by real-time PCR. *Clin Chem* 2004; 50(3):516-21
9. Finning K, Martin P, Daniels G. A clinical service in the UK to predict fetal Rh (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma. *Ann.N.Y.Acad.Sci* 2004; 1022:119-123
10. Gautier E, Benachi A, Giovannardi Y, Ernault P *et al.* Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:666-9
11. Moise, K. J. Fetal RhD typing with free DNA in maternal plasma. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192(3):663-5
- 12 Bustamante-Aragones A, Garcia-Hoyos M, Rodriguez de Alba M *et al.* Detection of a paternally inherited fetal mutation in maternal plasma by the use of automated sequencing. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1075:108-17
- 13 Bustamante-Aragones A, Vallespin E, Rodriguez de Alba M *et al.* Early non-invasive prenatal diagnosis of a fetal CRB1 mutation causing Leber Congenital Amaurosis. *Mol Vis* 2008 (in press)

14. Gonzalez-Gonzalez MC, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ et al. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002; 22(10):946-8
15. Li Y, Holzgreve W, Page-Christiaens GC, Gille JJ, Hahn S. Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma-case report. *Prenat Diagn* 2004; 24(11):896-8
16. Dhallan R, Guo X, Emche S et al. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet* 2007; 10;369(9560):474-81
17. Lo YM, Tsui NB, Chiu RW et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 2007; 13:218-23
18. Bustamante-Aragones, Rodriguez de Alba M, Gonzalez-Gonzalez M et al. Foetal sex determination in maternal blood from the seventh week of gestation and its role in diagnosing haemophilia in the foetuses of female carriers. *Haemophilia* 2008; 14:393-398
19. Norbury G, Norbury CJ. Non-invasive prenatal diagnosis of single gene disorders: How close are we? *Semin Fetal Neonatal Med* 2008; 13(2):76-83
20. Gonzalez-Gonzalez C, M.J Trujillo, M. Rodríguez de Alba *et al.* Huntington disease-unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn* 2003; 23:232-234
21. Gonzalez-Gonzalez C, M.J Trujillo, M. Rodríguez de Alba, Ramos C. Early Huntington disease prenatal diagnosis by maternal semiquantitative fluorescent-PCR. *Neurology* 2003; 60(7):1214-1215
22. Moutou C, Gardes N, Viville S. New tools for preimplantation genetic diagnosis of Huntington's disease and their clinical applications. *Eur J Hum Genet* 2004; 12(12):1007-1014
23. Chan KCA, Zhang J, Hui ABY *et al.* Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004; 50:88-92
24. 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
25. Nance MA, Myers RH. Juvenile onset Huntington's disease—clinical and research perspectives. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2001;7(3): 153-157

4.2 Diagnóstico prenatal no invasivo de una mutación fetal en el gen CRB1 asociada a amaurosis congénita de Leber

Ana Bustamante-Aragonés, Elena Vallespín, Marta Rodríguez de Alba, María José Trujillo-Tiebas, Cristina González-González, Dan Diego-Álvarez, Rosa Riveiro-Álvarez, Isabel Lorda-Sánchez, Carmen Ayuso, Carmen Ramos

Mol Vis (2008)

La amaurosis congénita de Leber (LCA) es una de las distrofias de retina más graves, con una edad temprana de inicio. Mutaciones en el gen CRB1 son responsables del 10-24% de los casos de LCA en diferentes poblaciones. El presente estudio muestra la detección en plasma materno de una mutación fetal asociada a LCA mediante el uso de una técnica no empleada previamente en el campo del diagnóstico prenatal no invasivo (DPNI): la técnica de dHPLC (**d**enaturing **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography).

El feto del presente estudio era portador de dos mutaciones distintas y de diferente origen parental en el gen CRB1 (1q3.1-q32.2). Con el fin de estudiar la mutación fetal de origen paterno, se recogió una muestra de plasma materno a las 12^a semana de gestación y se estudió mediante las técnicas de dHPLC y de secuenciación automática. Además se diseñó una batería de diluciones seriadas de ADN paterno (paterno) en ADN control (silvestre) para conocer el límite de detección del dHPLC.

La mutación fetal fue detectada en el plasma materno mediante dHPLC pero no mediante secuenciación automática. Además mediante la comparación del patrón generado por las diluciones seriadas y el patrón obtenido por la muestra de plasma materno, se pudo inferir que el porcentaje de ADN fetal en la muestra de plasma estudiada era de aproximadamente un 2-5%.

La técnica de dHPLC ha demostrado ser eficaz en la detección de pequeñas cantidades de ADN fetal en plasma materno. Podría ser una herramienta útil para el diagnóstico prenatal no invasivo de mutaciones de origen paterno.

Early non-invasive prenatal detection of a fetal *CRB1* mutation causing Leber congenital amaurosis

Ana Bustamante-Aragones, Elena Vallespin, Marta Rodriguez de Alba, Maria Jose Trujillo-Tiebas, Cristina Gonzalez-Gonzalez, Dan Diego-Alvarez, Rosa Riveiro- Alvarez, Isabel Lorda-Sanchez, Carmen Ayuso, Carmen Ramos

Department of Genetics, Fundacion Jimenez Diaz-Capio, CIBERER, Madrid, Spain
Correspondence to: Ana Bustamante-Aragones, Department of Genetics, Fundacion Jimenez Diaz, Avda. Reyes Catolicos 2, 28040 Madrid, Spain; Phone: +34 915504872 8 or +34 915504873; FAX: +34 91 5448735; email: abustamante@fjd.es

ABSTRACT

Purpose: Leber congenital amaurosis (LCA) is one of the most severe inherited retinal dystrophies with the earliest age of onset. Mutations in the *Crumbs homologue 1* (*CRB1* OMIM 600105) gene explain 10%–24% of cases with LCA depending on the population. The aim of the present work was to study a fetal mutation associated to LCA in maternal plasma by a new methodology in the non-invasive prenatal diagnosis field: the denaturing High Performance Liquid Chromatography (dHPLC).

Methods: This study presents the case of a compound heterozygous fetus for two mutations in *CRB1* (1q3.1-q32.2). dHPLC and automated DNA sequencing were used to detect the paternally inherited fetal mutation in a maternal plasma sample collected at the 12th week of gestation. To test the detection limit of dHPLC, we made serial dilutions of paternal DNA in control DNA.

Results: We were able to detect the presence of the paternally inherited fetal *CRB1* mutation in maternal plasma by dHPLC. Moreover, by comparing chromatograms of serial dilutions to the plasma sample, we could ascertain that the percentage of fetal DNA in maternal plasma was at least 2%. However, the detection of the fetal mutation was not possible by automated DNA sequencing.

Conclusions: dHPLC seems to be sensitive enough to detect small amounts of fetal DNA in maternal plasma samples. It could be a useful tool for the non-invasive prenatal detection of paternally inherited point mutations associated with retinopathies.

INTRODUCTION

Leber congenital amaurosis (LCA; OMIM 204000) is a severe form of inherited retinal dystrophy with the earliest onset [1-6]. LCA is generally inherited in an autosomal recessive manner although some autosomal dominant families have been described [7-9]. Nonsyndromic LCA has so far been associated with mutations in 12 genes (RetNet). Mutations in *Crumbs homologue 1* (*CRB1* OMIM 600105) have been associated with several visual disorders including retinitis pigmentosa (RP) with [10,11] or without [11,12] preserved para-arteriolar retinal pigment epithelium, paravenous pigmented chorioretinal atrophy [13], and LCA [14,15]. Of these disorders, LCA is the most severe form of inherited retinal dystrophy and is characterized by severe visual impairment from birth or very early in infancy and a decreased or absent electroretinogram (ERG) response [16]. Mutations in *CRB1* explain 10%–24% of cases with LCA depending on the population [4-9,17-21].

The first evidence of the existence of fetal material in maternal tissue was discovered in 1893. Fetal cells were found in the lungs of pregnant women who died of eclampsia [22]. But it was in the 1980s when this discovery was taken into consideration, opening the possibility to develop a non-invasive prenatal diagnosis (NIPD) to avoid the risk that obstetric invasive techniques entail. Fetal sex assessment and the study of the most common aneuploidies were the first diagnoses carried out from the analysis of fetal cells in maternal blood [23,24]. In 1997, Lo et al. [25] discovered the existence of circulating cell free fetal DNA (ccffDNA) in maternal blood. This discovery was based on the detection of Y-chromosome specific sequences in the maternal circulation of pregnant women bearing a male fetus. Once the presence of this fetal DNA in maternal plasma was widely demonstrated [26-28], some studies focused on the quantification of this fetal material [29-31]. These studies reported that the ccffDNA represented around 3%-6% of the total DNA present in the maternal plasma [29]. In addition, it was observed that the amount of ccffDNA increases throughout gestation [31] and disappears immediately after delivery [32].

An important limitation of these kind of studies is that, because of the presence of maternal DNA in the plasma samples, they are bound solely to the detection of paternally inherited fetal sequences. Therefore, the ccffDNA present in maternal plasma has been mainly used for fetal gender assessment [26-28], determination of fetal rhesus status in Rh-negative pregnant women [33-35], and detection of paternally inherited disorders [36-41]. Because of the low percentage of ccffDNA present in maternal plasma, all studies require the use of sensitive technologies. Real-time PCR (RT-PCR) has been the most widely used technique for this aim because its high sensitivity enables the detection of small amounts of target DNA sequences [28,42-44]. However, other approaches, such as restriction analysis [37] or quantitative fluorescent PCR (QF-PCR) [45,46], have been also used. In addition to these techniques, our group described in a previous report the use of automated DNA sequencing for the detection of a paternally inherited fetal mutation associated with an X-linked RP [41].

Here, we present the first evidence of the application of denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC) for the detection of an LCA-associated fetal mutation in maternal plasma. dHPLC is a technique currently used in diagnostic laboratories for the detection of point mutations or small deletions/insertions. However, to the best of our knowledge, this technology has not been applied in the NIPD field yet. The aim of this work is to report the use of this technique for the detection of a paternally inherited fetal mutation associated to LCA in maternal plasma in the first trimester of gestation.

METHODS

Patients

In the present study, the patient was an in utero fetus. The parents of the fetus came to our clinic to undergo a chorion biopsy for prenatal diagnosis. The parents were heterozygous for two different mutations in *CRB1*: the father carried the p.Cys896ter mutation in exon 8 and the mother the p.Cys948Tyr mutation in exon 9 (Figure 1).

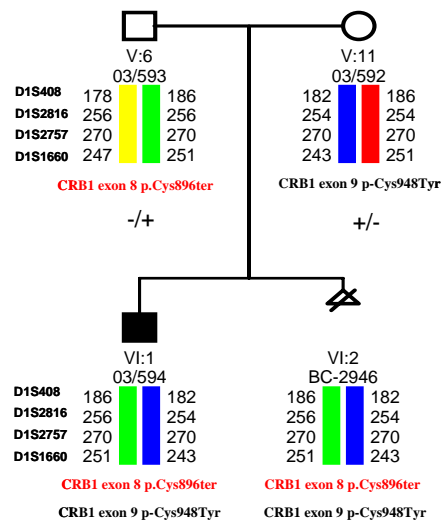


Figure 1: Genealogy of the family. Parents were carriers of a different mutation in the *CRB1* gene (paternal mutation in red colour). Haplotypes for four markers flanking the gene are showed (colour bars). The first child (VI:1) was affected with LCA. The probandus of the present study (VI:2) was carrier of both parental mutations.

Sample collection

Maternal blood (9 ml) was collected in EDTA tubes at the 12th week of gestation before the chorion biopsy was performed. This collection was done under informed consent and according to the Helsinki declaration. The sample was centrifuged at 1600x g for 10 min. Plasma was collected in 1 ml fractions and centrifuged at 16000x g for 10 min to eliminate all maternal cells present in the plasma sample. Supernatant was collected in new tubes and stored at -20°C .

In the present study, chorion villi sample was used as fetal control, paternal DNA served as positive control for the p.Cys896ter mutation and maternal DNA was used as wild- type control for the p.Cys896ter mutation.

DNA extraction

DNA was extracted from 2 ml of maternal plasma with the QIAmp DNA Blood MiniKit (Qiagen, Hilden, Germany) following the protocol recommended by the manufacturer with one modification: the eluate was reloaded into the column and centrifuged again. The parental DNAs were already available from previous studies. DNA extraction from the chorion villi sample was performed using the Tissue Extraction Kit in the BioRobot EZ1 (Qiagen) following the recommended protocol.

Polymerase chain reaction amplification

CRB1 is composed of 12 exons. The mutation carried by the father was in exon 8 (p.Cys896ter). A 276 bp fragment of exon 8 was amplified by PCR. Amplification was performed using 25 µl of DNA extracted from the plasma sample as a template. For controls (paternal DNA, maternal DNA, and chorion biopsy DNA), 2 ng of DNA were used as PCR control templates. The final volume of the reaction was 50 µl containing: 5 pmol of *CRB1*ex8 forward, 5'-CAA CAT TTT TCT ATT TAG TTG CC-3' (Applied Biosystems, Foster City, CA); 5 pmol of *CRB1*ex8 reverse, 5'-CTC AAA TGT CGC AAC TTA ACT G-3' (Applied Biosystems); 1X PCR buffer with 2.5 nM MgCl₂ (Roche, Indianapolis, IN); 200 µM each deoxynucleotide; and 1U of FastStart Taq DNA Polymerase (Roche). Amplification was performed in a GeneAmp PCR System 2700 thermal cycler (Applied Biosystems). After an initial incubation of 95 °C for 10 min, the reaction was cycled for 30 s at 95 °C, 20 s at 60 °C, and 50 s at 74 °C for 40 cycles, followed by a final extension of 5 min at 74 °C. PCR products were analyzed by two different methods: dHPLC and automated sequencing.

Denaturing high performance liquid chromatography

In this technique, the PCR products are denatured and subsequently subjected to a slow renaturalization. During renaturalization, complementary sequences perfectly reanneal, creating homoduplex forms. However, the presence of a different nucleotide in a specific position in one of the strands of DNA will generate mismatched double-stranded DNA fragments called heteroduplexes. dHPLC can reveal the presence of differences in the sequences based on the detection of the heteroduplex forms. Denaturing of the PCR products was performed at 95 °C for 5 min, and posterior renaturing was done at room temperature for over 1 h. dHPLC analysis was performed using a WAVETM DNA fragment Analysis System (Transgenomic Inc., Omaha, NE). Subsequently, 5 µl of renatured products were loaded on a C18 reversed-phase column (DNASepTM column; Transgenomic) and analyzed with an acetonitrile gradient formed by mixing buffers A and B (WAVE OptimizedTM; Transgenomic). The

optimal partial denaturing temperature used was 59.9 °C, which was calculated by the WAVE Maker program (Ver. 4.1; Transgenomic Inc.). In order to know the detection limit of the dHPLC for the p.Cys896ter mutation, a battery of serial dilutions of paternal DNA (carrier control) in maternal DNA (wild-type DNA) was made. These dilutions were made with different ratios of paternal DNA/maternal DNA (% of paternal DNA): 50/50 (50%), 25/75 (25%), 15/85 (15%), 10/90 (10%), 5/95 (5%), 4/96 (4%), 3/97 (3%), 2/98 (2%), and 1/99 (1%).

Automated sequencing

PCR products were purified by QIAGEN Purification Kit columns (Qiagen). The plasma sample was eluted in 30 µl of elution buffer and the controls in 50 µl. Based on the manufacturer's recommendations, the sequencing reaction was performed in a final volume of 20 µl containing 5 µl of purified PCR product for the controls and 10 µl for the plasma sample, 10 pmol of CRB1ex8 forward or reverse primer, and dRhodamine terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Bioscience). The product was electrophoresed in an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Bioscience) and analyzed with the Sequencing Analysis 5.1.1 software package (Applied Bioscience).

RESULTS

Denaturing high performance liquid chromatography analysis

dHPLC analysis of the control DNA for the mutation in exon 8 (maternal DNA) and the heterozygous mutant control (paternal DNA) revealed two different and distinguishable chromatograms. The control DNA chromatogram showed a unique peak generated by the homoduplex forms. However, the heterozygous mutant control presented a different pattern comprised three peaks: one peak corresponding to the homoduplexes, and two smaller additional peaks corresponding to the heteroduplex forms (Figure 2).

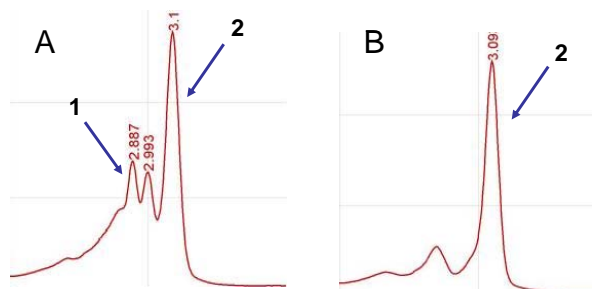


Figure 2: Chromatograms of the control DNAs obtained by dHPLC. After the PCR amplification of exon 8 of the CRB1 gene (where the p.Cys896ter mutation is located), the PCR products were analyzed by dHPLC. **A:** Electropherogram showed by the paternal DNA (carrier for the p.Cys896ter mutation). 1: Double-peak generated by the heteroduplexes forms associated to the presence of the p.Cys896ter mutation in the sample. 2: Peak generated by the homoduplexes. The presence of both homo and heteroduplexes peaks indicates a heterozygous genotype for the p.Cys896ter mutation. **B:** Electropherogram showed by the maternal DNA (wild-type for the p.Cys896ter mutation). 2: Peak generated by the homoduplexes. The only presence of homoduplexes peak represents a wild-type genotype.

Chromatograms from the serial dilutions showed how the two peaks corresponding to the heteroduplex forms diminished as the amount of paternal DNA in the mix decreased. In mixes with low concentrations of paternal DNA, these two peaks became a “slight peak” which was visible until the 2/98 (2%) dilution. When the mutation was in a percentage lower than 2% it was not detectable because the chromatogram was similar to the one showed by the maternal DNA. (Figure 3)

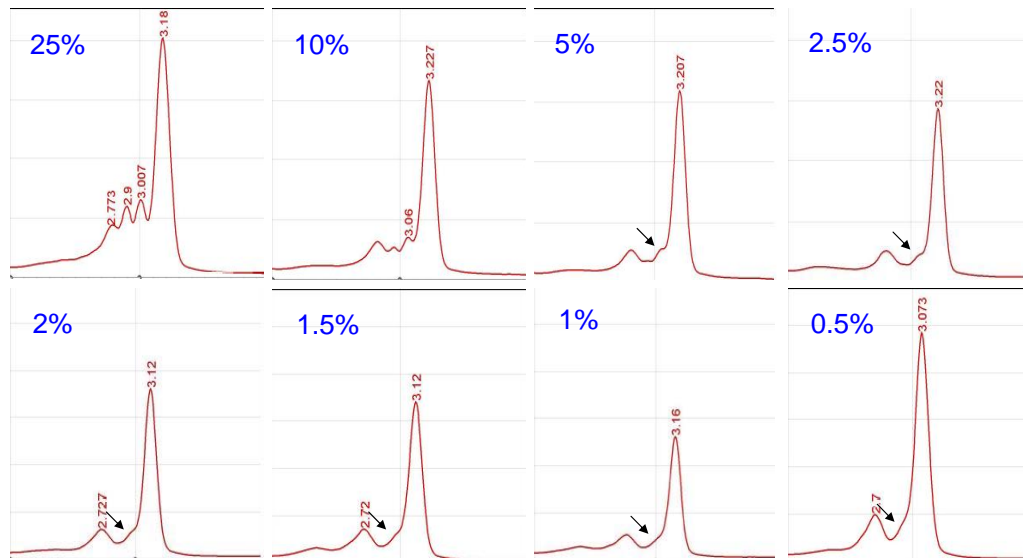


Figure 3: Chromatograms showed by the analysis of the serial dilutions by the dHPLC. The percentage data indicate the amount of the carrier DNA present in the dilution. The double-peak corresponding to the heteroduplexes decreases in size as the percentage of mutant DNA in the sample gets lower. From the 5% to the 2% dilution, the double-peak becomes a slight peak (pointed by the arrows in the figure). Below the 2%, the heteroduplexes could not be distinguished. These chromatograms revealed that the mutation was detectable up to the 2% dilution.

Analysis of the plasma sample showed a chromatogram in which the ‘slight peak’, previously observed in the 5% and 2% dilution controls and associated to the mutation, was present (Figure 4). The presence of this slight peak in the maternal plasma sample chromatogram represented the presence of the paternally inherited fetal mutation. The analysis of the chorion biopsy revealed that the fetus had inherited the paternal mutation.

Sequencing analysis

The detection of the paternal mutation (p.Cys896ter) was determined by the presence of an adenine (instead of a thymine) at the mutation site (c.2688 T>A). We were not able to detect the paternal mutation in the plasma sample by automated sequencing. However, the mutation was observed in the analysis of the chorion villi sample.

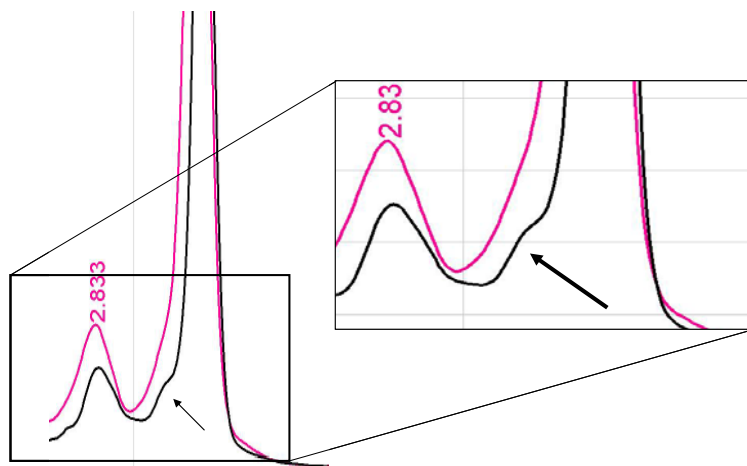


Figure 4. Analysis of the maternal plasma sample by dHPLC. **A:** Chromatograms from the maternal plasma sample (black graph) and the wild-type control DNA chromatogram (pink graph). They are shown overlapped in order to be compared. The arrow points the peak shape in the graph associated to the presence of the p.Cys896ter mutation in the maternal plasma sample and not present in the wild-type chromatogram; **B:** Enlarge image from the region of interest revealing the carrier condition of the fetus for the p.Cys896ter mutation.

DISCUSSION

Different techniques have been applied to detect fetal DNA in maternal plasma. The tools most commonly used are RT-PCR, QF-PCR, and restriction analysis. However, the adoption of new emerging techniques, usually more sensitive, may increase the possible diagnoses to be offered by the non-invasive prenatal diagnosis.

In the present study, the parents of the fetus were heterozygous for a different mutation in different exons of *CRB1*. The aim of this work was to introduce the dHPLC technology for the detection of a paternally inherited fetal mutation associated to LCA in maternal plasma in the first trimester of gestation. Exclusion of the paternal mutation in the maternal plasma would indicate that the fetus was, at worst, a carrier of the maternal mutation. Therefore, conventional invasive procedures could be avoided.

Used as a screening tool, the dHPLC technique searches for unknown mutations in large scale studies or known mutations in new patients with a previously diagnosed relative. Some advantages of this tool are its easy handling, its ability to rapidly process samples, and its low cost. Moreover, it has shown excellent results in clinical practice [47].

Considering the low percentage of ccffDNA in the maternal plasma previously reported [29] and in order to know the detection limit of the dHPLC for the p.Cys896ter mutation, serial dilutions of paternal DNA (carrier for the mutation) were made. In addition, the comparison of the migration patterns between the serial dilutions and the plasma sample was the strategy followed to determine the genotype of the fetus for the paternal mutation.

Analysis of the chromatograms from the dilutions helped to establish the detection limit of the technique for the p.Cys896ter mutation as 2% of carrier DNA present in the sample. This high level of detection made us look at this technique as a promising tool for the detection of fetal DNA in maternal blood. This hypothesis was confirmed when we were able to detect the mutation by analyzing the maternal plasma sample. The correspondence of the migration patterns of the serial dilutions (5% and 2% dilutions) with the one showed by the plasma sample let us ascertain the carrier condition of the fetus for the paternal mutation. Besides, this assay design also allowed us to speculate that the amount of fetal DNA represented around 2% to 5% of the total DNA present in the plasma sample analyzed.

In a previous paper, we reported the detection, by automated sequencing, of a fetal mutation associated to a X-linked Retinitis Pigmentosa in maternal plasma collected at the 19th week of gestation [41]. However, a sample collected from the same pregnancy at the 10th week was also analyzed but the mutation was not detected [41]. In the present study, the paternally inherited fetal mutation has been detected in the maternal plasma (at the 12th week) by the dHPLC method but not by automated sequencing. Therefore both studies, in which automated sequencing has been used, are concordant about the inefficiency of the technique for detection of ccffDNA in maternal plasma samples in the first trimester of gestation. This fact would be in accordance with previous reports about the scarcity of ccffDNA in the first trimester of gestation [30,31].

This work opens up the possibility to incorporate the dHPLC technique for the study of paternally inherited fetal mutations in maternal plasma. It has shown to be sensitive enough to detect ccffDNA in the first trimester of gestation. However the automated sequencing technique has not been efficient for the detection of ccffDNA at this early stage of gestation. The creation of serial dilutions containing low percentages of paternal DNA has shown to be an essential strategy for the analysis of paternally inherited fetal mutations in maternal plasma by dHPLC. Considering that the detection limit of the technique could be variable for the analysis of different mutations, further studies are required to evaluate the accuracy of the method for other mutational changes.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Ministry of Health PI040218, CIBERER CB06/07/0036 and EVI-GENORET LSHG-CT-2005-512036. Ana Bustamante and Elena Vallespin are supported by Fundacion Conchita Rabago de Jimenez Diaz. Thanks to Diego Cantalapiedra and Hamish Binns for their collaboration with the idiom.

REFERENCES

1. Leber T. Über Retinitis Pigmentosa und angeborene Amaurose. Albrecht Von Graefes Arch Ophthalmol 1869; 15:1–25.
2. Perrault I, Rozet JM, Calvas P, Gerber S, Camuzat A, Dollfus H, Châtelin S, Souied E, Ghazi I, Leowski C, Bonnemaïson M, Le Paslier D, Frézal J, Dufier JL, Pittler S, Munnich A, Kaplan J. Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis. Nat Genet 1996; 14:461–4.
3. Cremers FP, Van der Hurk J, den Hollander A. Molecular genetic of Leber congenital amaurosis. Hum Mol Genet 2002; 11:1169–76.
4. Fazzi E, Signorini SG, Scelsa B, Bova SM, Lanzi G. Leber's congenital amaurosis: an update. Eur J Paediatr Neurol 2003; 7:13–22.
5. Allikmets R. Leber congenital amaurosis: a genetic paradigm. Ophthalmic Genet 2004; 25:67–79.
6. Hanein S, Perrault I, Gerber S, Tanguy G, Barbet F, Ducroq D, Calvas P, Dollfus H, Hamel C, Lopponen T, Munier F, Santos L, Shalev S, Zafeiriou D, Dufier JL, Munnich A, Rozet JM, Kaplan J. Leber Congenital Amaurosis: Comprehensive Survey of the Genetic Heterogeneity, Refinement of the Clinical Definition, and Genotype-Phenotype Correlations as a Strategy for Molecular Diagnosis. Hum Mutat 2004; 23:306–17.
7. Heckenlively RJ. *Retinitis Pigmentosa*. 1988. Lippincott, Philadelphia
8. Sohocki MM, Sullivan LS, Mintz-Hittner HA, Birch D, Heckenlively JR, Freund CL, McInnes RR, Daiger SP. A range of clinical phenotypes associated with mutations in *CRX*, a photoreceptor transcription-factor gene. Am J Hum Genet 1998; 63:1307–15.
9. Tzekov RT, Liu Y, Sohocki MM, Zack DJ, Daiger SP, Heckenlively JR, Birch DG. Autosomal dominant retinal degeneration and bone loss in patients with a 12-bp deletion in the *CRX* gene. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001; 42:1319–27.
10. den Hollander AI, ten Brink JB, de Kok YJ, van Soest S, van den Born LI, van Driel MA, van de Pol DJ, Payne AM, Bhattacharya SS, Kellner U, Hoyng CB, Westerveld A, Brunner HG, Bleeker-Wagemakers EM, Deutman AF, Heckenlively JR, Cremers FP, Bergen AA. Mutations in a human homologue of *Drosophila* crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12). Nat Genet 1999; 23:217–21.
11. Bernal S, Calaf M, Garcia-Hoyos M, Garcia-Sandoval B, Rosell J, Adan A, Ayuso C, Baiget M. Study of the involvement of the *RGR*, *CRPB1*, and *CRB1* genes in the pathogenesis of autosomal recessive retinitis pigmentosa. J Med Genet 2003; 40:e89.
12. Lotery AJ, Malik A, Shami SA, Sindhi M, Chohan B, Maqbool C, Moore PA, Denton MJ, Stone EM. *CRB1* mutations may result in retinitis pigmentosa without para-arteriolar RPE preservation. Ophthalmic Genet 2001b; 22:163–9.
13. McKay GJ, Clarke S, Davis JA, Simpson DA, Silvestri G. Pigmented paravenous chorioretinal atrophy is associated with a mutation within the crumbs homolog 1 (*CRB1*) gene. Invest Ophthalmol Vis Sci 2005; 46:322–8.
14. den Hollander AI, Heckenlively JR, van den Born LI, de Kok YJ, van der Velde-Visser SD, Kellner U, Jurklics B, van Schooneveld MJ, Blankenagel A, Rohrschneider K, Wissinger B, Cruysberg JR, Deutman AF, Brunner HG, Apfelstedt-Sylla E, Hoyng CB, Cremers FP. Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (*CRB1*) gene. Am J Hum Genet 2001; 69:198–203.
15. Lotery AJ, Jacobson SG, Fishman GA, Weleber RG, Fulton AB, Namperumalsamy P, Héon E, Levin AV, Grover S, Rosenow JR, Kopp KK, Sheffield VC, Stone EM. Mutations in the *CRB1* gene cause Leber congenital amaurosis. Arch Ophthalmol 2001; 119:415–20.

16. De Laey JJ. Leber's congenital amaurosis. *Bull Soc Belge Ophthalmol* 1991; 241:41–50.
17. Zernant J, Külm M, Dharmaraj S, den Hollander AI, Perrault I, Preising MN, Lorenz B, Kaplan J, Cremers FP, Maumenee I, Koenekoop RK, Allikmets R. Genotyping microarray (disease chip) for Leber congenital amaurosis: detection of modifier alleles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:3052–9.
18. Hanein S, Perrault I, Gerber S, Tanguy G, Barbet F, Ducroq D, Calvas P, Dollfus H, Hamel C, Loppönen T, Munier F, Santos L, Shalev S, Zafeiriou D, Dufier JL, Munnich A, Rozet JM, Kaplan J. Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype–phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. *Hum Mutat* 2004; 23:306–17.
19. Galvin JA, Fishman GA, Stone EM, Koenekoop RK. Evaluation of genotype–phenotype associations in leber congenital amaurosis. *Retina* 2005; 25:919–29.
20. Yzer S, Leroy BP, De Baere E, de Ravel TJ, Zonneveld MN, Voeselek K, Kellner U, Ciriano JP, de Faber JT, Rohrschneider K, Roepman R, den Hollander AI, Cruysberg JR, Meire F, Casteels I, van Moll-Ramirez NG, Allikmets R, van den Born LI, Cremers FP. Microarray-based mutation detection and phenotypic characterization of patients with Leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:1167–76.
21. Vallespin E, Cantalapiedra D, Riveiro-Alvarez R, Wilke R, Aguirre-Lamban J, Avila-Fernandez A, Lopez-Martinez MA, Gimenez A, Trujillo-Tiebas MJ, Ramos C, Ayuso C. Mutation screening of 299 Spanish families with retinal dystrophies by Leber congenital amaurosis genotyping microarray. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:5653–61.
22. Schmörl G. Pathologisch-anatomische untersuchungen ueber Publerekampsie. *Vogel* 1893; Leipzig.
23. Rodríguez De Alba M, Palomino P, Jurado A, Sanz R, Ibañez MA, Fernández- Moya JM, Ayuso C, Díaz-Recasens J, Lahoz C, Ramos C. Prenatal diagnosis on fetal cells obtained from maternal peripheral blood: report of 66 cases. *Prenat Diagn* 1999; 19:934–40.
24. Rodríguez de Alba M, Palomino P, González-González C, Lorda-Sanchez I, Ibañez MA, Sanz R, Fernández-Moya JM, Ayuso C, Díaz-Recasens J, Ramos C. Prenatal diagnosis on fetal cells from maternal blood: practical comparative evaluation of the first and second trimesters. *Prenat Diagn* 2001; 21:165–70.
25. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350:485–7.
26. 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.
27. Guibert J, Benachi A, Grebille AG, Ernault P, Zorn JR, Costa JM. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003; 18:1733–6.
28. Bustamante-Aragones A, Rodríguez de Alba M, Gonzalez-Gonzalez C, Trujillo-Tiebas MJ, Diego-Alvarez D, Vallespin E, Plaza J, Ayuso C, Ramos C. Foetal sex determination in maternal blood from the seventh week of gestation and its role in diagnosing haemophilia in the foetuses of female carriers. *Haemophilia* 2008; 14:593–8.
29. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62:768–75.
30. 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; 51:312–20.

31. Galbiati S, Smid M, Gambini D, Ferrari A, Restagno G, Viora E, Campogrande M, Bastonero S, Pagliano M, Calza S, Ferrari M, Cremonesi L. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum Genet* 2005; 117:243–8.
32. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999; 64:218–24.
33. Harper TC, Finning KM, Martin P, Moise KJ Jr. Use of maternal plasma for non-invasive determination of fetal RhD status. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:1730–2.
34. Gautier E, Benachi A, Giovangrandi Y, Ernault P, Olivi M, Gaillon T, Costa JM. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192:666–9.
35. Moise KJ. Fetal RhD typing with free DNA in maternal plasma. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192:663–5.
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, García-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, Gallardo E, Ayuso C, Ramos C. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002; 22:946–8.
38. Li Y, Holzgreve W, Page-Christiaens GC, Gille JJ, Hahn S. Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma—case report. *Prenat Diagn* 2004; 24:896–8.
39. Nasis O, Thompson S, Hong T, Sherwood M, Radcliffe S, Jackson L, Otevreil T. Improvement in sensitivity of allele-specific PCR facilitates reliable non-invasive prenatal detection of cystic fibrosis. *Clin Chem* 2004; 50:694–701.
40. Li Y, Di Naro E, Vitucci A, Zimmermann B, Holzgreve W, Hahn S. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size- fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA* 2005; 293:843–9.
41. Bustamante-Aragones A, Garcia-Hoyos M, Rodriguez DE, Alba M, Gonzalez- Gonzalez C, Lorda-Sanchez I, Diego-Alvarez D, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C, Ramos C. Detection of a paternally inherited fetal mutation in maternal plasma by the use of automated sequencing. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1075:108–11.
42. Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Samura O, Kinutani M, Hara T, Ohama K. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet* 2002; 110:75–9.
43. Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D, Voslarova S, Kofler J, Komrska V, Habart D. Replicate real-time PCR testing of DNA in maternal plasma increases the sensitivity of non-invasive fetal sex determination. *Prenat Diagn* 2003; 23:235–8.
44. Ho SS, Damayanti Z, Chua WY, Ng BL, Peh CM, Biswas A, Choolani M. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal gender using real-time polymerase chain reaction amplification of SRY in maternal plasma. *Ann Acad Med Singapore* 2004; 33(Suppl):S61–2.
45. González-González MC, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, García-Hoyos M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C. Huntington disease- unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn* 2003; 23:232–4.
46. González-González MC, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, Ramos C. Early Huntington disease prenatal diagnosis by maternal semiquantitative fluorescent- PCR. *Neurology* 2003; 60:1214–5.

47. Stenirri S, Fermo I, Battistella S, Galbiati S, Soriani N, Paroni R, Manitto MP, Martina E, Brancato R, Allikmets R, Ferrari M, Cremonesi L. Denaturing HPLC Profiling of the ABCA4 Gene for Reliable Detection of Allelic Variations. *Clin Chem* 2004; 50:1336–43.

4.3 Nueva estrategia para la detección/exclusión prenatal en plasma materno de mutaciones de origen paterno asociadas a fibrosis quística

Ana Bustamante-Aragonés, Jesús Gallego, María José Trujillo-Tiebas, Marta Rodríguez de Alba, Cristina González-González, Guillermo Glover, Dan Diego-Álvarez, Carmen Ayuso, Carmen Ramos

J Cyst Fibros (2008)

El estudio del ADN fetal presente en plasma materno podría emplearse para realizar un diagnóstico prenatal de fibrosis quística sin implicar ningún riesgo para el feto ni para la madre. En este trabajo se presenta una nueva estrategia para la detección en plasma materno de diferentes mutaciones fetales asociadas a fibrosis quística y de herencia paterna.

Se ha estudiado plasma materno de tres gestaciones diferentes, en cada una de las cuales, ambos progenitores eran portadores de una mutación diferente asociada a fibrosis quística. Además, la mutación paterna era distinta en cada caso. El genotipado del feto para la mutación paterna se realizó mediante una técnica de minisequenciación conocida como SNaPshot.

Se detectó la presencia de la mutación paterna en dos de las muestras estudiadas. Esto indicó la condición de portador para la mutación paterna del feto en dichas gestaciones. Por el contrario, en uno de los casos analizados la ausencia de la mutación fetal en el plasma materno reveló la condición no portadora del feto para dicho defecto. Los resultados obtenidos en el posterior análisis de las vellosidades coriales confirmaron los resultados obtenidos en sangre materna.

La correcta exclusión de la mutación paterna en plasma materno evitaría la necesidad de un diagnóstico prenatal convencional en los casos en los que se descartase la condición portadora del feto para dicho defecto. La técnica de SNaPshot ha mostrado ser un método sensible y eficaz para la detección de mutaciones fetales en plasma materno. Su fácil manejo, rapidez y bajo coste hace de ella un método apropiado para una futura aplicación en la rutina clínica del diagnóstico prenatal no invasivo de fibrosis quística.



New strategy for the prenatal detection/exclusion of paternal cystic fibrosis mutations in maternal plasma[☆]

Ana Bustamante-Aragones^{a,*}, Jesus Gallego-Merlo^a, Maria Jose Trujillo-Tiebas^a,
Marta Rodriguez de Alba^a, Cristina Gonzalez-Gonzalez^b, Guillermo Glover^c,
Dan Diego-Alvarez^a, Carmen Ayuso^a, Carmen Ramos^a

^a Department of Genetics. Fundacion Jimenez Diaz-Capio, CIBERER. 28040. Madrid, Spain

^b Department of Genetics, San Rafael Hospital, Madrid, Spain

^c Department of Genetics, Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain

Received 8 February 2008; received in revised form 16 May 2008; accepted 19 May 2008

Abstract

Background: Since the presence of fetal DNA was discovered in maternal blood, different investigations have focused on non-invasive prenatal diagnosis. The analysis of fetal DNA in maternal plasma may allow the diagnosis of fetuses at risk of cystic fibrosis (CF) without any risk of fetal loss. Here, we present a new strategy for the detection of fetal mutations causing CF in maternal plasma.

Methods: We have used a mini-sequencing based method, the SNaPshot[®], for fetal genotyping of the paternal mutation in maternal blood from three pregnancies at risk of CF.

Results: The paternal mutation was detected in the analysis of plasma samples from cases 1 and 3 but not in case 2. Results of a posterior conventional molecular analysis of chorionic biopsies were in full agreement with those obtained from analysis of the plasma samples.

Conclusions: The knowledge about the inheritance of the paternal mutation in a fetus may avoid the conventional prenatal diagnosis in some cases. The SNaPshot[®] technique has been shown to be a sensitive and accurate method for the detection of fetal mutations in maternal plasma. Its ease handling, rapid and low cost makes it appropriate for a future routine clinical use in non-invasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis.

© 2008 European Cystic Fibrosis Society. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Fetal mutation; Non-invasive prenatal diagnosis; Cystic fibrosis; Mini-sequencing method

1. Background

Prenatal diagnosis of cystic fibrosis (CF) (OMIM #279100) is currently recommended to those couples in which both members are known to be carriers of a CF mutation. However, the current obstetric procedures to perform the prenatal

diagnosis of an inherited monogenic disorder imply the invasion of the intrauterine environment, which entails a significant risk of miscarriage (0.5–1%).

Non-invasive prenatal diagnosis (NIPD) is based on the study of circulating cell-free fetal DNA (cffDNA) present in maternal blood [1]. This non-invasive diagnostic method presents great advantages, but also some limitations. The great advantage is the absence of fetal loss, thus allowing the performance of a safe genetic study of the fetus. On the other hand, two important limitations to be considered are the coexistence of this cffDNA with circulating DNA of maternal origin and the low percentage of the total DNA that it represents (3–6%) [2–4]. The presence of maternal DNA in the plasma sample limits the diagnosis to the detection of paternally-inherited fetal sequences that are

[☆] The present work was presented as an oral communication titled “Prenatal Diagnosis of Cystic Fibrosis” as part of the Scientific Program of the Circulating Nucleic Acids in Plasma/Serum V (CNAPS V) conference which took place in Moscow (Russian Federation) in August, 23–27, 2007.

* Corresponding author. Department of Genetics. Fundacion Jimenez Diaz-Capio, CIBERER. Avda. Reyes Catolicos, 2. 28040. Madrid, Spain. Tel.: +34 91 550 48 72; fax: +34 91 544 87 35.

E-mail address: abustamante@fjd.es (A. Bustamante-Aragones).

different from those present in the mother. Sensitive technologies are thus required for these non-invasive studies due to the low levels of fetal DNA and the success in detecting fetal alleles strongly depends on which technique is chosen.

Since the presence of fetal DNA in maternal blood was reported in 1997 [1], several investigations have focused on developing different prenatal studies using cffDNA [5–14]. Two investigations, fetal gender assessment and Rh fetal determination, are beginning to be translated into routine clinical use [15,16]. However, other studies that are still in the research setting, such as the prenatal diagnosis of fetal mutations or aneuploidies [17,18,19–21], may also be incorporated into clinical diagnostic algorithms in future years.

At present, different sensitive and easy handling technologies are being developed for the detection of SNPs. As these methodologies are designed to detect single-base changes, we hypothesised about the possible application of these techniques for the detection of paternally-inherited fetal mutations in maternal plasma. The clinical basis of this hypothesis was aimed at those pregnancies at risk of having a fetus affected with a recessive disease such cystic fibrosis. NIPD can thus offer an alternative to these patients through the study of a paternal mutation in maternal plasma. Knowledge of the inheritance of a paternal mutation by the analysis of maternal plasma could avoid undergoing invasive procedures when the mutation carried by the father is excluded.

We looked for a methodology which will be appropriate to use for the future clinical diagnosis of paternally-inherited fetal mutations and we opted for the use of a mini-sequencing-based methodology, referred to as SNaPshot® (Applied Biosystems). We chose this technique because of its easy and rapid use, sensitivity, and low cost. In the present work, fetuses from three pregnancies at risk of cystic fibrosis were genotyped for the mutation carried by their fathers by this method.

2. Methods

This study was performed on plasma samples collected from three pregnancies at risk of having a fetus affected with cystic fibrosis. Participants came to our service to undergo chorionic biopsy because of the risk of CF and they were asked to participate in this research study.

In the three pregnancies, both parents were carriers of a different CF mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane

Conductance Regulator (CFTR) gene and, in addition, the paternal mutation was distinct in each case as follows: p.Arg668Cys (case 1) and p.Lys710ter (case 2), both located in exon 3 of the CFTR gene, and p.Tyr1092ter (case 3) located in exon 17b of the CFTR gene (Table 1).

2.1. Sample collection

Twenty millilitres of maternal blood from each pregnant woman were collected in EDTA tubes, under informed consent and in accordance with the Helsinki Declaration. Samples were obtained during the 12th week of gestation before chorionic biopsy was performed. In case 3, an additional maternal blood sample was obtained during the 15th week of gestation.

Nine millilitres of peripheral blood from the parents of each fetus was collected in EDTA tubes under informed consent.

2.2. Plasma sample processing

Samples were processed within 24 h of blood collection. Blood samples were centrifuged at 1600 rpm for 10 min in the original collection tube. Plasma was collected, divided in 1-mL aliquots, and centrifuged at 14,000 rpm for 10 min. Both centrifugations were carried out at room temperature. The supernatant was removed from each aliquot and stored at -20°C .

2.3. DNA extraction

Plasma samples were thawed at room temperature. Two millilitres of maternal plasma from each pregnant woman was used for DNA extraction using the QIAamp DNA Blood MiniKit (QIAGEN) according to the protocol previously reported [14].

DNA from the parents of each pregnancy was extracted from 350 μl of peripheral blood by the BioRobot EZ1 (QIAGEN).

2.4. PCR controls

For each mutation studied, positive and negative controls were used. In each case, DNA from the father was used as the heterozygous control (positive control) and maternal DNA was used as the wild-type control for the paternal mutation (negative control).

Table 1
Description of the parental mutations and their location in the CFTR gene for each case

Case	Maternal mutation	Paternal mutation (PT) base change	Location of PT in CFTR gene	PCR primers	SNaPshot primer
1	p.Phe508del	p.Arg668Cys C \Rightarrow T	Exon 13	Forward: 5'-TGATTCTTTTCGACCAATTTAGTG-3' Reverse: 5'-ATCTGGTACTAAGGACAG-3'	5'-AATTC AATCCTA ACTGAGACCTTACAC-3'
2	p.Val542ter	p.Lys710ter A \Rightarrow T	Exon 13	Forward: 5'-TGATTCTTTTCGACCAATTTAGTG-3' Reverse: 5'-ATCTGGTACTAAGGACAG-3'	5'-TTCTCAATCCAATCAACTCTATACGA-3'
3	c.3849+10 kb C>T	p.Tyr1092ter C \Rightarrow A	Exon 17b	Forward: 5'-GGAGTCCAATTTTCACTCATCTTGT-3' Reverse: 5'-CCTGTTGTAAAATGGAAATGAAGG-3'	5'-ACATACTGCCAACTGGTCTTGTGA-3'

Primer sequences used for amplification are also listed.

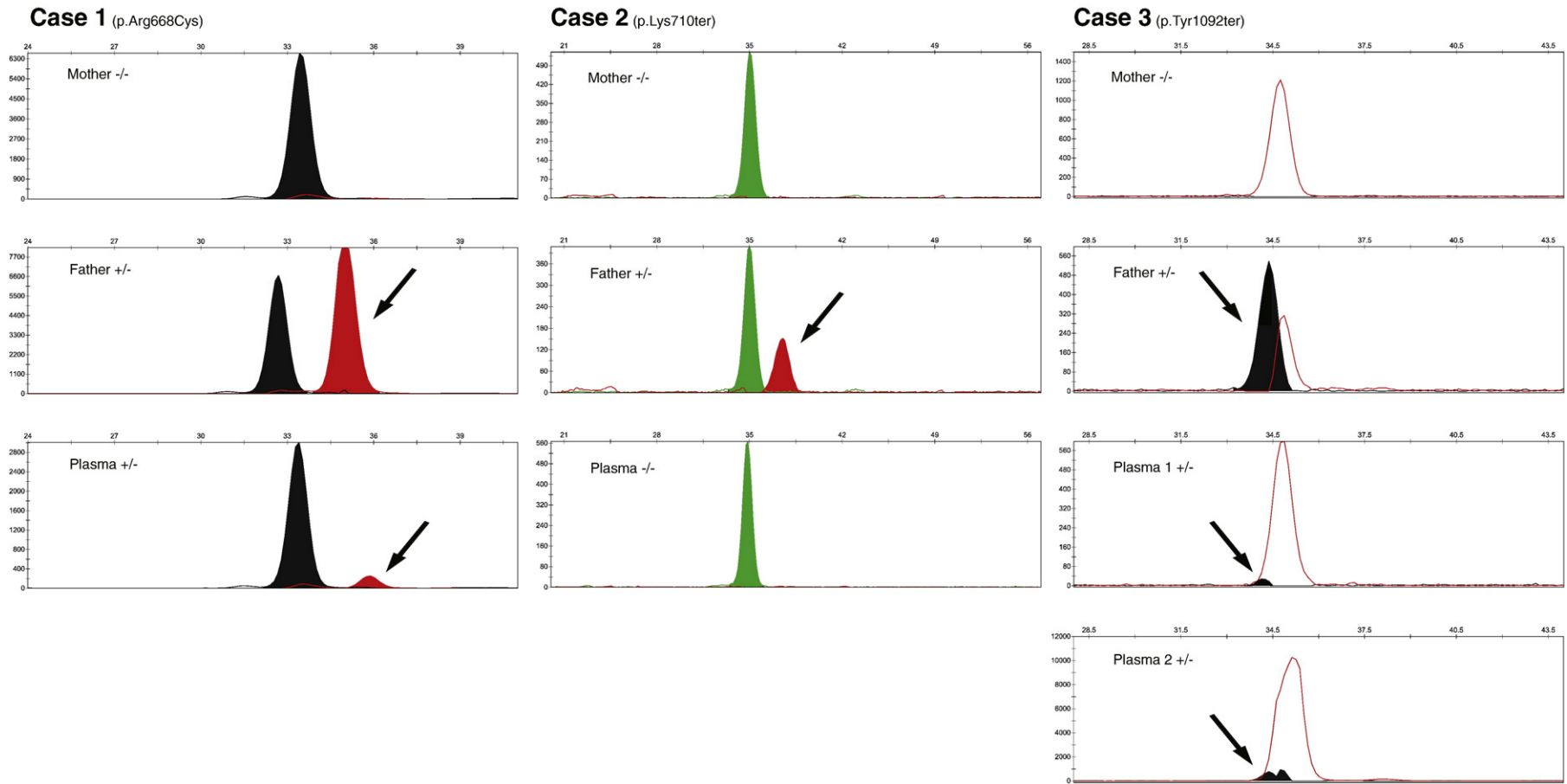


Fig. 1. Electropherograms of the parental DNA controls (Mother, as negative control and Father, as positive control) and the maternal plasma samples (Plasma) of each case. x axis, computed length of PCR products in base pairs as determined automatically by the use of internal lane standard; y axis, fluorescence intensities in arbitrary units. The arrows show the peak which represents the mutation. Case 1: Wild-type and mutated nucleotide (paternal mutation) are present in the plasma sample. Case 2: The electropherogram of the plasma sample is similar to the one presented by the maternal DNA, only the wild-type nucleotide is present. Case 3: In Plasma 1 (sample collected during the 12th week of gestation) and in Plasma 2 (sample collected during the 15th week of gestation), the peak associated with the paternal mutation is detected.

2.5. PCR amplification

PCR was carried out in a GeneAmp PCR System 2700 thermal cycler (Applied Biosystems). For the amplification, 16.3 μ l of DNA from the plasma samples and 100 ng of DNA from the controls were used as templates. PCR conditions in each case were as follows:

2.5.1. PCR for exon 13 (cases 1 and 2)

The final volume was 25 μ l, containing 7.5 pmol of each primer (forward: 5'-TGATTCTTTTCGACCAATTTAGTG-3'; reverse: 5'-ATCTGGTACTAAGGACAG-3'; Applied Biosystems), 1 \times PCR buffer with 2.5 nM MgCl₂ (Roche), 200 μ M of each deoxynucleotide (Invitrogen), and 1 U of FastStart Taq DNA polymerase (Roche). After an initial incubation at 95 °C for 5 min, the reaction was cycled for 30 s at 95 °C, 20 s at 55 °C, and 50 s at 74 °C for 40 cycles, followed by a final extension of 5 min at 74 °C (Table 1).

2.5.2. PCR for exon 7b (case 3)

The final volume was 24 μ l, containing 10 pmol of each primer (forward: 5'-GGAGTCCAATTTTCACTCATCTTGT-3'; reverse: 5'-CCTGTTGTAAAATGGAAATGAAGG-3'; Applied Biosystems), 1 \times PCR buffer with 2.5 nM MgCl₂ (Roche), 200 μ M of each deoxynucleotide (Invitrogen), and 1 U of FastStart Taq DNA polymerase (Roche). After an initial incubation at 94 °C for 5 min, the reaction was cycled for 40 s at 94 °C, 40 s at 58 °C, and 45 s at 72 °C for 40 cycles, followed by a final extension for 7 min at 72 °C (Table 1).

Excess primers and dNTPs were removed by the addition of 4 μ l of ExoSAP-IT (USB) to 10 μ l of PCR product and incubating the mixture at 37 °C for 15 min, followed by 80 °C for 15 min.

2.6. Mini-sequencing reaction

The SNaPshot[®] Multiplex System (Applied Biosystems) is a mini-sequencing method based on a fluorescent-labelled dideoxy single-base extension of an unlabeled oligonucleotide primer or primers which hybridise upstream to the SNP site. The four different ddNTPs (ddCTP, ddTTP, ddATP, and ddGTP) contained in the mini-sequencing reaction mix are labelled with a distinct fluorochrome. The only dideoxynucleotide incorporated to this primer during the reaction indicates the nucleotide present at the mutation site.

A specific primer was designed for each mutation studied. Eight μ l of purified PCR product from the plasma samples and 3 μ l from the controls were used as a template. The reaction was carried out in a final volume of 20 μ l, containing 10 μ l of SNaPshot[®] Multiplex Ready Reaction Mix (Applied Biosystems) and 20 pmol of the specific unlabeled primer, as follows: primer for case 1: 5'-AATTCAATCCTAACTGAGACCTTACAC-3'; primer for case 2: 5'-TTCTCAATCCAATCAACTCTATACGA-3'; and primer for case 3: 5'-ACATACTGCCAACTGGTCTTGTA-3' (Table 1). The reaction was cycled for 10 s at 96 °C, 5 s at 50 °C, and 30 s at 60 °C for 30 cycles.

Excess nucleotides were removed by the addition of 2 μ l (1 U/ μ l) of shrimp alkaline phosphatase enzyme and 2.4 μ l of

10 \times SAP Buffer (USB), and incubating the mixture at 37 °C for 1 h followed by 75 °C for 15 min.

Purified product from control DNAs was diluted 1:10 before being charged in the automated sequencer. For the analysis, 8 μ l of purified product from the plasma samples and 1 μ l from the controls were mixed with 12 μ l of Hi-Di formamide (Applied Biosystems) and 0.5 μ l of GeneScan 120Liz size standard (Applied Biosystems). The analysis was carried out in an ABI3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using GeneMapper software (Applied Biosystems).

3. Results

The analysis of the positive and negative control DNAs in each pregnancy (parental DNAs) revealed distinct electropherograms. The maternal DNA showed a electropherogram with a unique peak corresponding to the wild-type nucleotide in the mutation site. However, the paternal DNA, as heterozygous control, showed a peak corresponding to the mutation (paternal marker) in addition to the peak associated to the wild-type nucleotide (Fig. 1).

3.1. Plasma samples

In the analysis of the maternal plasma samples collected from the three pregnancies, the peak corresponding to the wild-type nucleotide in the mutation site was present because of the existence of maternal DNA in the sample. However, the paternal marker was only observed in cases 1 and 3 (Fig. 1). The existence of the paternal mutation in the plasma samples collected from cases 1 and 3 can only be explained for its fetal origin. In these two cases, the height of the peak associated to the mutation was much lower than the one associated to the wild-type nucleotide because of the low amount of fetal DNA present in the sample. In case 3, a second maternal blood sample was collected in the second trimester of the gestation. In the analysis of this second sample a higher peak corresponding to the paternally-inherited fetal mutation was observed.

In case 2, the electropherogram pattern observed in the analysis of the plasma sample was the same as the one produced by the negative control (maternal DNA). The peak associated with the mutation carried by the father and shown by the positive control was not present in the plasma sample (Fig. 1).

Posterior conventional molecular analysis of the biopsies revealed that only in cases 1 and 3 had the fetuses inherited the paternal mutation. Therefore, in all three cases studied, the analysis of the paternal mutation in the maternal plasma was in accordance with those results obtained in the conventional prenatal diagnosis.

4. Discussion

The prenatal diagnosis of cystic fibrosis is currently performed in those couples at risk of having an affected fetus; however, it carries a risk of miscarriage. NIPD, based on the study of ccfDNA present in maternal plasma, is an encouraging alternative methodology to provide information regarding the

fetal genotype and to avoid the risk of fetal loss. Some years ago, all publications pertaining to NIPD reported the hypothetical clinical applications of these studies. Currently some of the studies carried out by this methodology such as the fetal gender assessment or fetal Rh determination in maternal blood have already been translated into clinical routine [15,16]. Hence, some of the studies based on the use of fetal DNA in maternal blood are at present a real alternative offered in the genetic services for some patients.

Our group has been consistently working toward the direct clinical application of NIPD [7–9,14,16,22]. In this work, we hypothesized the application of a methodology designed for SNP detection to the diagnosis of fetal mutations in maternal plasma. In fetuses at risk of a recessive disease such as cystic fibrosis, knowledge of the inheritance of the paternal mutation in the first trimester of gestation provides additional information to be considered for genetic counselling. In the case of fetuses at risk of cystic fibrosis, exclusion of the paternal mutation in the maternal plasma would indicate that the fetus was, at worst, a carrier of the maternal mutation. Therefore, conventional invasive procedures could be withheld. However, if the paternal mutation was present, conventional prenatal diagnosis would be recommended in order to determine the fetal status with respect to the maternal mutation. At present, the existence of maternal DNA in the maternal plasma sample limits this study to those couples in which both members are carriers of different CF mutations. However the highest mutation heterogeneity reported in European and Middle Eastern areas would make this diagnosis highly applicable in those populations [23,24]. In Spain, the frequency of the DeltaF508 mutation is lower than in other Caucasian populations [25]. As a reference laboratory for the study of CF, our experience in the last eight years reflects that approximately 56% of the prenatal diagnoses were performed in couples in which both members were carriers of a different CF mutation. Therefore, this non-invasive method would be applicable in this percentage of pregnancies at risk.

Pursuing the future clinical application of this non-invasive approach, we have selected a new technology based on a mini-sequencing reaction, the so-called SNaPshot® (Applied Biosystems). Previous studies have reported the non-invasive detection of SNPs [26–28] and fetal CF mutations [7,29–30] in maternal plasma. However, the techniques used in those publications require complicated handling to be applied in clinical practice or are not valid to study any mutation. The great advantage that the mini-sequencing technique presents is the ease and rapid handling, the high sensitivity and the low cost. Further, it gives evident results which are very important when we are working with limited amounts of maternal plasma.

In the present study, we have carried out the genotyping of three fetuses for the CF mutation carried by their fathers by the SNaPshot® technique (Applied Biosystems). Since for each of the pregnancies studied both parents were a carrier of a different CF mutation, the presence of the paternal mutation in the maternal plasma could only be explained by its fetal origin. Such was the case for those maternal plasma samples collected from cases 1 and 3. In those two cases, the paternal mutation was detected in the plasma samples, indicating the carrier

condition of the fetus for the mutation of paternal origin. In case 3 the detection of the fetal mutation was more evident in the sample collected at the 15th weeks than the one collected in the first trimester of gestation. These results were in accordance with the reported increase in the amount of fetal DNA during gestation [2,4]. Our group has previously reported a large-scale validation study about the presence of cfDNA in maternal plasma in the first trimester of gestation, demonstrating the existence of fetal DNA in all those maternal plasma samples collected from the 7th week of gestation [16]. Since the present work has been carried out using the same methods for collection and DNA extraction than the aforementioned study, the absence of the paternal mutation in the plasma sample of case 2 was interpreted as the non-carrier status of the fetus. However, the possibility to incorporate an independent test to validate the presence of the fetal DNA in the plasma sample would eliminate the risk of false negatives. In the present study this confirmation could not be performed because of the scarcity of plasma in case 2 and the impossibility to obtain more sample from this pregnant woman. Results obtained in the subsequent analysis of the chorionic biopsies were in full agreement with those obtained from the plasma samples. Therefore, based on this criterion of presence/absence, the fetal genotype for the paternal mutation was correctly diagnosed in all three cases, revealing the sensitivity and robust accuracy of this technique.

This work introduces an easy-to-use and sensitive technique for the detection of fetal mutations causing cystic fibrosis in maternal plasma during the first trimester of pregnancy. Through the effective exclusion of inheritance of the paternal mutation, the need for invasive prenatal diagnostic procedures could be eliminated in half of these pregnancies. However the incorporation of a supplementary independent test to demonstrate the presence of cfDNA in the maternal plasma sample may help to eliminate the possibility of false negatives. Additional large-scale prospective collaborative studies will be necessary to support these preliminary results. Once the accuracy were widely demonstrated the field of application could be widen and opened to the preimplantation diagnosis field. It could be used as a confirmatory tool for those selected embryos without the paternal mutation. In conclusion, the high sensitivity inherent in the SNaPshot® technique makes it a promising tool to be applied to the non-invasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis.

Acknowledgements

This work has been supported by the Ministry of Health (PI040218). Thanks to Diego Cantalapiedra for his assistance.

Ana Bustamante is supported by “Fundacion Conchita Rabago de Jimenez Diaz”.

References

- [1] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485–7.
- [2] Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Ann Hum Genet* 1998;62:768–75.

- [3] Angert RM, LeShane ES, Lo YM, Chan LY, Delli-Bovi LC, Bianchi DW. Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: analysis of first- and third-trimester samples. *Clin Chem* 2003;49:195–8.
- [4] Galbiati S, Smid M, et al. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum Genet* 2005;117:243–8.
- [5] Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet* 2000;30(356):1170.
- [6] Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YM. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* Sep 28 2002;360(9338):998–1000.
- [7] Gonzalez-Gonzalez MC, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, et al. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002;22:946–8.
- [8] Gonzalez-Gonzalez MC, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, et al. Huntington disease-affected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn* 2003a;23(3):232–4.
- [9] Gonzalez-Gonzalez MC, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, Ramos C. Early Huntington disease prenatal diagnosis by maternal semiquantitative fluorescent-PCR. *Neurology* 2003b;8(60):1214–5.
- [10] Harper TC, Finning KM, Martin P, Moise Jr KJ. Use of maternal plasma for noninvasive determination of fetal RhD status. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:1730–2.
- [11] Ho SS, Damayanti Z, Chua WY, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal gender using real-time polymerase chain reaction amplification of SRY in maternal plasma. *Ann Acad Med Singap* 2004;33:S61–62.
- [12] Li Y, Holzgreve W, Page-Christiaens GC, Gille JJ, Hahn S. Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma—case report. *Prenat Diagn* 2004;24:896–8.
- [13] Li Y, Di Naro E, Vitucci A, Zimmermann B, Holzgreve W, Hahn S. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA* 2005;293:843–9.
- [14] Bustamante-Aragones A, Garcia-Hoyos M, Rodriguez de Alba M, et al. Detection of a paternally inherited fetal mutation in maternal plasma by the use of automated sequencing. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1075:108–17.
- [15] Gautier E, Benachi A, Giovangrandi Y, et al. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:666–9.
- [16] Bustamante-Aragones A, Rodríguez de Alba M, Gonzalez-Gonzalez C et al. Fetal sex determination in maternal blood from the 7th week of gestation and its role in diagnosing haemophilia in the fetuses of female carriers. *Haemophilia* in press, Article.
- [17] Tong YK, Ding C, Chiu RW, et al. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: theoretical and empirical considerations. *Clin Chem* 2006;52:2182–3.
- [18] 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;10(369):474–81.
- [19] 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.
- [20] Old RW, Crea F, Puszyk W, Hultén MA. Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome. *Reprod Biomed Online* 2007 Aug;15(2):227–35.
- [21] Dennis Lo YM, Chiu RW. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis. *Clin Chem* 2008;54(3):461–6 [Electronic publication 2008 Jan 17].
- [22] González-González C, Garcia-Hoyos M, Trujillo-Tiebas MJ, Lorda-Sanchez I, de Alba MR, Infantes F, et al. Application of fetal DNA detection in maternal plasma: a prenatal diagnosis unit experience. *J Histochem Cytochem* 2005;53:307–14.
- [23] Farez-Vidal ME, Gomez-Llorente C, Blanco S, Morales P, Casals T, Gomez-Capilla JA. Multimutational analysis of eleven Cystic Fibrosis mutations in the Mediterranean areas. *Clin Chem* 2004;11:2155–7.
- [24] Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM. Cystic Fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations—correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002;19:575–606.
- [25] Ezquieta B, Ruano ML, Dulín E, Arnao DR, Rodríguez A. Prevalence of frequent recessive diseases in the Spanish population through DNA analyses on samples from the neonatal screening. *Med Clin (Barc)* 2005;125:493–5.
- [26] Li Y, Hahn D, Wenzel F, Holzgreve W, Hahn S. Detection of SNPs in the plasma of pregnant women and in the urine of kidney transplant recipients by mass spectrometry. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1075:144–7.
- [27] Li Y, Wenzel F, Holzgreve W, Hahn S. Genotyping fetal paternally inherited SNPs by MALDI-TOF MS using cell-free fetal DNA in maternal plasma: influence of size fractionation. *Electrophoresis* 2006;27:3889–96.
- [28] Chow KC, Chiu RW, Tsui NB, et al. Mass spectrometric detection of an SNP panel as an internal positive control for fetal DNA analysis in maternal plasma. *Clin Chem* 2007;53:141–2.
- [29] Nasis O, Thompson S, Hong T, Sherwood M, Radcliffe S, Jackson L, et al. Improvement in sensitivity of allele-specific PCR facilitates reliable noninvasive prenatal detection of cystic fibrosis. *Clin Chem* 2004;50:694–701.
- [30] Saker A, Benachi A, Bonnefont JP, Munnich A, Dumez Y, Lacour B, et al. Genetic characterisation of circulating fetal cells allows non-invasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Prenat Diagn* 2006;26:906–16.

4.4 Diagnóstico prenatal en plasma materno de una mutación fetal asociada a acidemia propiónica

Ana Bustamante-Aragonés, Celia Pérez-Cerdá, Belén Pérez, Marta Rodríguez de Alba, Magdalena Ugarte, Carmen Ramos

Mol Genet Metab (2008)

La acidemia propiónica (AP) es una de las enfermedades más frecuentes del metabolismo de los ácidos orgánicos. Debido a su severidad, el diagnóstico prenatal se ofrece actualmente a parejas en las que ambos miembros son portadores de una mutación asociada a AP. El estudio del ADN fetal presente en sangre materna podría emplearse para el diagnóstico prenatal no invasivo de la enfermedad.

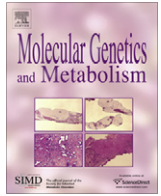
Se recogió plasma materno a las 12 semanas de gestación de una gestante con riesgo de tener un feto afectado de AP. Se estudió la mutación portada por el padre en la muestra de plasma materno mediante dos métodos diferentes: minisequenciación y curvas de *melting*. Se detectó la mutación fetal en el plasma materno mediante ambos métodos. Estos resultados fueron confirmados mediante el estudio de la biopsia corial.

El análisis de ADN fetal presente en sangre materna ha permitido la detección de una mutación fetal asociada a AP a las 12 semanas de gestación. Aunque los dos métodos utilizados son sencillos, rápidos y de bajo coste, los resultados que proporciona la minisequenciación son más objetivos. Por el contrario ésta técnica requiere el diseño de un primer específico para cada mutación a estudiar mientras que el análisis por curvas de *melting* no lo requiere. Actualmente este diagnóstico no invasivo estaría limitado a parejas en las que cada miembro porta una mutación diferente. Sin embargo, la frecuencia de heterocigotos compuestos es del 80% tanto para AP como para la mayoría de las enfermedades metabólicas heredadas. Esto implica que este método de diagnóstico prenatal no invasivo tendría un alto potencial diagnóstico para el estudio prenatal de AP y otras enfermedades metabólicas de origen genético.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymgme

Brief Communication

Prenatal diagnosis in maternal plasma of a fetal mutation causing propionic acidemia

Ana Bustamante-Aragones ^{a,*}, Celia Pérez-Cerdá ^b, Belén Pérez ^b, Marta Rodríguez de Alba ^a, Magdalena Ugarte ^b, Carmen Ramos ^a^a Department of Genetics, Fundacion Jimenez Diaz-Capio, CIBERER, Avda. Reyes Catolicos, 2, 28040, Madrid, Spain^b Centro de diagnóstico de enfermedades moleculares, Dpto. de Biología Molecular, Facultad de Ciencias, CIBERER, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 April 2008

Received in revised form 21 May 2008

Accepted 21 May 2008

Available online xxxx

Keywords:

Propionic acidemia

Non-invasive prenatal diagnosis

Fetal DNA

Maternal plasma

ABSTRACT

Prenatal diagnosis (PD) is available to families affected with propionic acidemia (PA), however, it entails a risk of miscarriage. Fetal DNA circulating in maternal blood could allow performing a safe prenatal diagnosis of fetal mutations. Exclusion of the paternal mutation in maternal plasma may avoid conventional PD in cases of recessive disorders such as PA. In this work, we have correctly diagnosed in maternal plasma the status of a fetus at risk of PA for the paternal mutation.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Propionic Acidemia (PA; MIM #606054) is one of the most frequent inborn disorders of organic acid metabolism caused by a deficiency of propionyl-CoA carboxylase (PCC). The disorder is clinically heterogeneous but in most of the patients there is a neonatal clinical onset associated with development delay and early death. It is an autosomal recessive disorder caused by mutations in PCCA and PCCB genes which encode α and β subunits of PCC, respectively [1].

Due to the severity of the disease, prenatal diagnosis (PD) is currently offered to those families affected with PA [2,3]. However, invasive obstetric procedures are required to obtain fetal material for the diagnosis and those imply a risk of fetal loss (0.5–1%).

The non-invasive prenatal diagnosis (NIPD) is mainly based on the analysis of circulating cell-free fetal DNA (cffDNA) present in maternal plasma [4–5]. This fetal DNA represents 3–6% of the total DNA present in maternal plasma [5]. The main advantage of this diagnosis is the absence of fetal loss that it entails. However, the presence of maternal DNA in the plasma sample limits this diagnosis to the analysis of sequences of paternal origin which are not present in the mother. Some approaches of the NIPD are at present a reality into the clinical diagnosis [6–7]. However, other studies that still remain into the research field, such as analysis of fetal

mutations, could be also incorporated into the clinical routine in a near future [8–10].

In this work, we have studied maternal plasma from a pregnant woman at risk of having a fetus affected with PA. We aimed to determine the status of the fetus for the paternal mutation. As a recessive disorder, non-invasive prenatal exclusion of the paternal mutation causing PA would avoid unnecessary invasive testing and its risk of fetal mortality.

Materials and methods

A previous affected child with PA revealed the carrier condition of the parents for a different mutation in the PCCB gene: c.1514T>A (mother) and c.1218del14ins12 (father). Twenty milliliters of peripheral blood from the pregnant woman were collected in an EDTA tube, under informed consent, before chorion villus sampling was performed at 12 weeks of gestation. Sample processing for plasma collection and DNA extraction was carried out as previously described [6]. Two analytical methods were used: a primer extension method and a melting curve analysis. Paternal and maternal DNAs were used as positive and negative controls, respectively.

Single base primer extension method

The method previously described was followed [10]. Amplification of a fragment including the position of the paternal mutation was carried out using the following set of primers (PCCB-Forward: GTGAGGACTTGTGGGTATCTAGT; PCCB-Reverse: TTGCTGAGGCACTGTACC) (Applied Biosystems, Foster, USA). PCR was carried out from 17.3 μ l of DNA from the plasma sample and 100 ng of control DNAs using an annealing temperature of 55 °C and for 40 cycles. Before the primer extension reaction, purification of PCR products

* Corresponding author. Fax: +34 91 544 87 35.

E-mail address: abustamante@fjd.es (A. Bustamante-Aragones).

was carried out by ExoSAP-it (USB). For the primer extension reaction an oligonucleotide primer which hybridises upstream to the first nucleotide which is changed because of the ins/del mutation, was designed (AGGCACAGCACAGGAATACGG). Seven microliters of purified PCR product from the plasma sample and 3 μ l from the controls were used as a template. The reaction was carried out in a final volume of 20 μ l, containing 10 μ l of SNaPshot[®] Multiplex Ready Reaction Mix (Applied Biosystems) and 10 pmol of the specific unlabeled primer. The reaction was cycled for 10s at 96°C, 5s at 50°C, and 30s at 60°C for 35 cycles. Excess ddNTPs were removed by SAP enzyme (USB) and then PCR products were analyzed in an ABI3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Melting curves analysis

For the melting analysis two extra controls were used: (a) four maternal plasma samples, as negative controls and (b) a battery of dilutions for the paternal mutation (positive control). These dilutions were made by mixing decreasing amounts of paternal DNA (10%, 5%, and 2%) in maternal DNA in order to simulate the maternal plasma sample.

Six microliters of DNA from the plasma sample (in triplicate) and 100ng from the control DNAs were used as template. The

reaction was carried out in a LightCycler480 (Roche) in a final volume of 20 μ l containing 5 pmol of each primer (PCCB-Forward and PCCB-Reverse), 10 μ l of LightCycler480 High Resolution Melting Master Mix 2 \times and 40 mM MgCl₂ (Roche) and 10.8 nmol of control DNA. After an initial incubation of 95°C for 10 min the reaction was cycled for 45 cycles at 95°C for 10s, 15s at 55°C, and 15s at 72°C. After amplification a program for Melting Curves generation was performed at 95°C for 1 min, 40°C for 1 min, and 65°C for 1 s followed by a cooling program at 40°C for 30s.

Results and discussion

The analysis of the controls (parental DNAs, maternal plasma controls and serial dilutions) revealed how the pattern for each genotype by each method used was. In order to get a diagnosis, they were then compared with the pattern showed by the maternal plasma sample (Fig. 1).

Single base primer extension reaction

The use of this method for the detection of fetal mutations in maternal plasma has already been reported by our group showing promising results [10]. In the single base primer extension

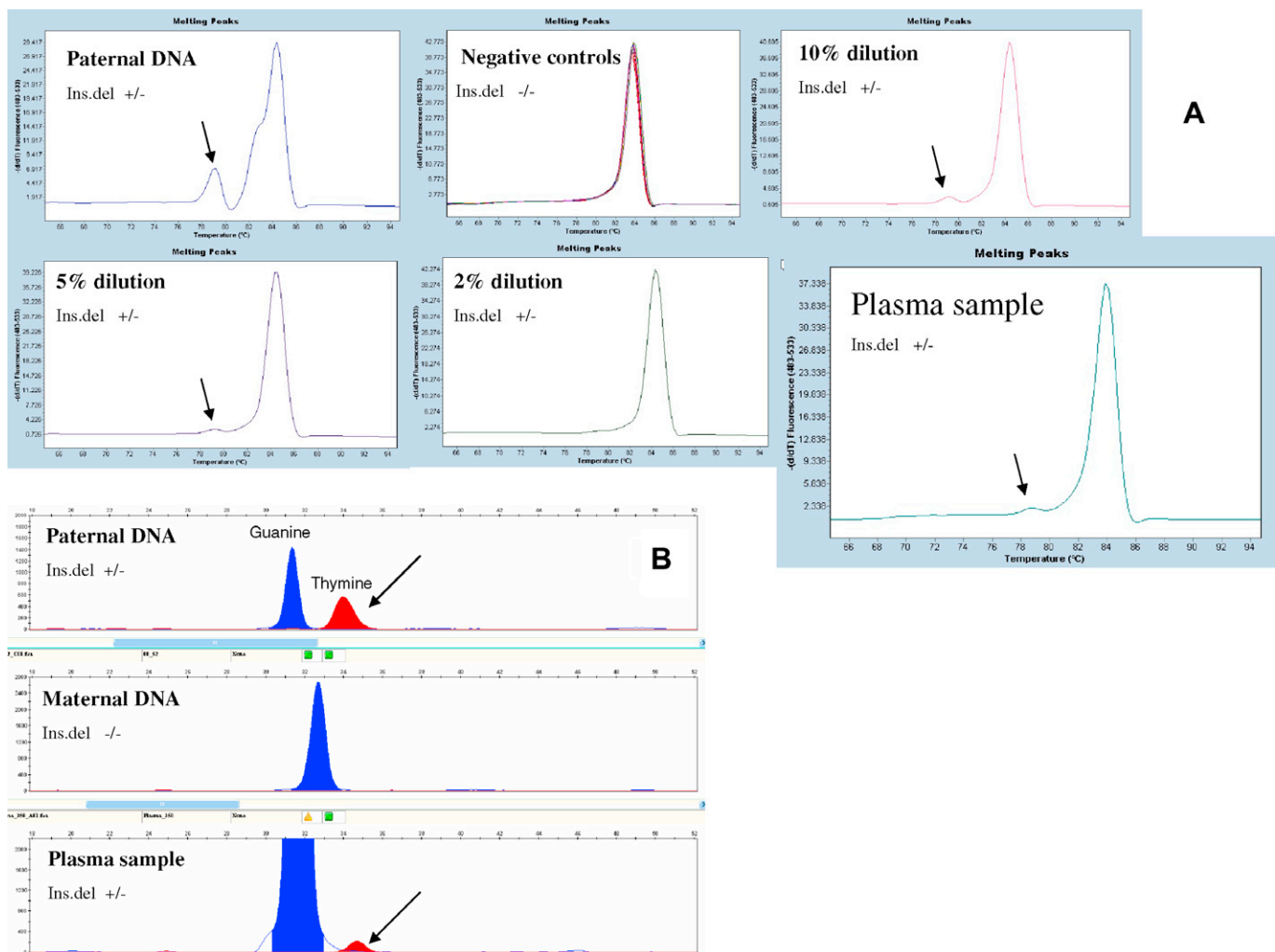


Fig. 1. Analysis of the paternal mutation (c.1218del14ins12). Genotype is indicated. (A) Melting curve analysis. The arrow shows the pattern generated by the mutation. The mutation is detected in the paternal DNA, 10% and 5% dilutions and plasma sample. The mutation pattern is not observed in the negative controls (maternal plasma controls and maternal DNA) and 2% dilution. (B) Primer extension analysis. The arrows show the peak associated to the mutation. The mutation is observed in the paternal DNA and plasma sample.

reaction the only dideoxynucleotide incorporated to the primer is associated to a specific genotype; in this case the Guanine was associated to the wild-type genotype while the mutant genotype was represented by a thymine. Analysis of the maternal plasma sample showed the presence of both nucleotides. The existence of the thymine in the maternal plasma sample can only be explained by its fetal origin, indicating the carrier status of the fetus for the paternal mutation. (Fig. 1B). The lower height of the peak for the thymine is due to the low amount of fetal DNA circulating in maternal plasma (3–6%) and the presence of maternal DNA [5].

Melting curves analysis

The analysis of the plasma sample DNA revealed the carrier condition of the fetus for the paternal mutation (Fig. 1A).

The design of serial dilutions was crucial for this analytical method in order to infer the presence of the fetal mutation in the plasma sample. The analysis of these controls revealed that the melting curve for the plasma sample was similar to the one presented by the 5% dilution control (Fig. 1A). Because the mutation studied involves a large number of base pairs and this could have facilitated the detection, further studies in order to test the sensitivity for other mutations need to be done.

Conventional molecular analysis of the chorion biopsy confirmed these findings revealing the successful determination of the fetal status for the paternal mutation in the maternal plasma by both molecular methods.

In conclusion, this study shows the detection of a paternally inherited fetal mutation causing PA in maternal plasma at the 12th week of gestation by two different methods. Although both methods used are sensitive, low cost, and rapid, those results obtained by the primer extension method are more objective. On the contrary, the primer extension method requires the design of a specific primer for each mutation to be analyzed while the melting curve analysis does not. The PA mutation studied in this work (c.1218del14ins12) is the most frequent one in Caucasian population. At present, this diagnosis would be limited to those cases in which both members are carriers of a different PA mutation. However, in our experience as reference laboratory for diagnosis of PA, the 80% of the patients are compound heterozygotes and, in addition, this frequency is quite similar in other metabolic inherited diseases. Therefore, this method would have a high potential in prenatal diagnosis of PA and other metabolic diseases. When the paternal mutation is detected in the maternal plasma conventional prenatal diagnosis is necessary in order to determine the fetal status for the maternal mutation and, therefore, the condition of

affected or unaffected fetus for the disease. On the other hand, the exclusion of the paternal mutation in recessive disorders such as PA could avoid posterior invasive methods for prenatal diagnosis. However, since this diagnosis is based on an exclusion criterion, the incorporation of a supplementary independent test to demonstrate the presence of cfDNA in the maternal plasma sample may help to eliminate the possibility of false negatives. The early gestational age in which this study can be carried out would allow undergoing chorion villus sampling in case it would be required.

Acknowledgements

Thanks to Eva Ainsé for its collaboration in this study. Ana Bustamante is supported by Fundacion Conchita Rabago de Jimenez Diaz. This work has been supported by CIBERER.

References

- [1] L.R. Desviat, B. Pérez, C. Pérez-Cerda, P. Rodríguez-Pombo, S. Clavero, G. Prema, Propionic acidemia: mutation update and functional and structural effects of the variant alleles, *Mol. Genet. Metab.* 83 (2004) 28–37.
- [2] C. Pérez-Cerda, B. Pérez, B. Merinero, L.R. Desviat, P. Rodríguez Pombo, G. Prema, Prenatal diagnosis of propionic acidemia, *Prenat. Diagn.* 24 (2004) 962–964.
- [3] S. Muro, C. Pérez-Cerda, P. Rodríguez-Pombo, B. Pérez, P. Briones, A. Ribes, M. Ugarte, Feasibility of DNA based methods for prenatal diagnosis and carrier detection of propionic acidemia, *J. Med. Genet.* 36 (1999) 412–414.
- [4] Y.M. Lo, N. Corbetta, P.F. Chamberlain, V. Rai, I.L. Sargent, C.W. Redman, J.S. Wainscoat, Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum, *Lancet* 350 (1997) 485–487.
- [5] Y.M. Lo, M.S. Tein, T.K. Lau, C.J. Haines, T.N. Leung, P.M. Poon, J.S. Wainscoat, P.J. Johnson, A.M. Chang, N.M. Hjelm, Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis, *Am. J. Hum. Genet.* 62 (1998) 768–775.
- [6] A. Bustamante-Aragones, M. Rodríguez de Alba, C. Gonzalez-Gonzalez, M.J. Trujillo-Tiebas, D. Diego-Alvarez, E. Vallespin, J. Plaza, C. Ayuso, C. Ramos, Fetal sex determination in maternal blood from the 7th week of gestation and its role in diagnosing haemophilia in the fetuses of female carriers, *Haemophilia* 14 (2008) 593–598.
- [7] E. Gautier, A. Benachi, Y. Giovangrandi, P. Ernault, M. Olivi, T. Gaillon, J.M. Costa, Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192 (2005) 666–669.
- [8] H. Saito, A. Sekizawa, T. Morimoto, M. Suzuki, T. Yanaihara, Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma, *Lancet* 30 (356) (2000) 1170.
- [9] M.C. Gonzalez-Gonzalez, M. Garcia-Hoyos, M.J. Trujillo, M. Rodríguez de Alba, I. Lorda-Sánchez, J. Díaz-Recasens, E. Gallardo, C. Ayuso, C. Ramos, Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma, *Prenat. Diagn.* 22 (2002) 946–948.
- [10] A. Bustamante-Aragones, J. Gallego-Merlo, M.J. Trujillo-Tiebas, M. Rodríguez de Alba, C. Gonzalez-Gonzalez, G. Glover, D. Diego-Alvarez, C. Ayuso, C. Ramos, New strategy for the prenatal detection/exclusion of paternal cystic fibrosis mutations in maternal plasma, *J. Cyst. Fibros.* (2008), doi:10.1016/j.jcf.2008.05.006.

4.5 Detección en plasma materno de una mutación fetal responsable de retinosis pigmentaria mediante secuenciación automática

Ana Bustamante-Aragonés, María García-Hoyos, Marta Rodríguez de Alba, Cristina González-González, Isabel Lorda-Sánchez, Dan Diego-Álvarez, María José Trujillo-Tiebas, Carmen Ayuso, Carmen Ramos

Ann N Y Acad Sci. (2006) 1075:108-117

El descubrimiento del ADN fetal circulante en sangre materna abrió la posibilidad de desarrollar un método no invasivo para el análisis genético prenatal. Hasta la fecha se han empleado diferentes técnicas para el estudio de este ADN fetal, sin embargo el uso de la secuenciación automática se ha descrito en un único caso. El objetivo del presente trabajo es la caracterización prenatal en plasma materno de una mutación de origen paterno, asociada a una retinopatía, mediante la técnica de secuenciación automática.

Para ello se recogieron dos muestras de plasma materno, una a la 10ª semana de gestación y otra a la 19ª semana, de una gestante cuyo marido era portador de una mutación (Q134X) en el gen RP2, gen localizado en el cromosoma X. Mutaciones en este gen están asociadas a retinosis pigmentaria. Se estudió la mutación paterna en las muestras de plasma materno mediante secuenciación automática y mediante análisis de restricción. Como el análisis de restricción es una técnica rutinariamente empleada en el campo del diagnóstico prenatal no invasivo, se empleó para la confirmación de los resultados.

La mutación fetal de origen paterno fue detectada por secuenciación automática en el plasma materno recogido en la 19ª semana de gestación, indicando la condición portadora del feto para dicha mutación. Estos resultados se confirmaron mediante el estudio por análisis de restricción en plasma materno y el estudio de la biopsia corial. En la muestra de plasma materno recogido a la 10ª semana no se detectó la mutación fetal. La secuenciación automática posibilita el estudio de secuencias fetales, a un nivel nucleotídico, con el fin de detectar mutaciones o polimorfismos diferentes a los existentes en el genoma materno.

Detection of a Paternally Inherited Fetal Mutation in Maternal Plasma by the Use of Automated Sequencing

ANA BUSTAMANTE-ARAGONES, MARIA GARCIA-HOYOS,
MARTA RODRIGUEZ DE ALBA, CRISTINA GONZALEZ-GONZALEZ,
ISABEL LORDA-SANCHEZ, DAN DIEGO-ALVAREZ,
M. JOSE TRUJILLO-TIEBAS, CARMEN AYUSO, AND CARMEN RAMOS

Department of Genetics, Fundacion Jimenez Diaz, Madrid, Spain

ABSTRACT: The discovery of circulating fetal DNA in maternal blood has been an encouraging step forward in the prenatal diagnostic field. It has opened up the possibility of development of a noninvasive method for the genetic analysis of the fetus. Many techniques have been applied to the study of this fetal DNA, but automated sequencing has been seldom used. The intention of this study was to use the automated sequencing technique for the detection of a paternally inherited fetal mutation in maternal plasma. Maternal plasma samples from a pregnant woman, whose husband had a mutation (Q134X) in the *RP2* gene, which is located in the X-chromosome, were collected at two different gestational ages (10th and 19th week of gestation) in order to determine whether the paternally inherited fetal mutation could be detected by automated sequencing. Restriction analysis was also performed to confirm the results. The fetal mutation was clearly detected in the maternal plasma by the use of automated sequencing. The automated sequencing enables the possibility of analyzing fetal sequences, at a nucleotide level, in order to detect mutations or polymorphisms which are distinguishable from maternal sequences.

KEYWORDS: fetal DNA; maternal blood; mutation; retinitis pigmentosa; automated sequencing

INTRODUCTION

Circulating cell-free fetal DNA in maternal blood was detected for the first time in 1997 by Lo *et al.*¹ This discovery opened up a new perspective for the development of noninvasive methods for prenatal diagnosis, thus avoiding the risk of fetal loss induced by invasive obstetric procedures. A first aim

Address for correspondence: ANA Bustamante, Department of Genetics, Fundacion Jimenez Diaz, Avda. Catolicos 2, 2840 Madrid, Spain. Voice: +34-915504872; fax: +34-915448735.
e-mail: abustamante@fjd.es

Ann. N.Y. Acad. Sci. 1075: 108–117 (2006). © 2006 New York Academy of Sciences.
doi: 10.1196/annals.1368.014

has been to look for an appropriate method to isolate the maximum amount of fetal DNA from maternal blood,²⁻⁵ because fetal DNA only represents 3–6% of total DNA.⁶ Once the presence of fetal DNA in maternal blood was widely demonstrated by the detection of Y-chromosome sequences, the technique gained momentum and many diverse studies started to appear. The most common approaches that demonstrate the presence of this circulating fetal DNA have been the detection of Y-chromosome sequences in male-bearing pregnancies,⁷⁻⁹ diagnosis of the fetal Rhesus-D status,¹⁰⁻¹² and the detection of paternally inherited mutations.¹³⁻¹⁵ Many other studies are contributing to the better understanding of the biology and behavior of this source of fetal genetic material.^{16,17} These studies have demonstrated that there are some factors that increase the quantity of cell-free fetal DNA in maternal circulation, such as gestational age,¹⁸ aneuploidy gestations like trisomy 21^{19,20} and trisomy 13²¹, and pathological pregnancies associated with placental abnormalities.^{22,23} All these reports describe the use of different techniques to detect and quantify fetal DNA in maternal circulation, such as conventional polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, quantitative fluorescence (QF)-PCR, and restriction analysis. However, to our knowledge there is only one report about the use of automated sequencing in fetal DNA from maternal plasma.²⁴

Here we present a case of a paternally inherited fetal mutation associated to X-linked retinitis pigmentosa (XLRP) studied in maternal plasma by automated sequencing analysis. Retinitis pigmentosa (RP) is a degenerative disease of the retina characterized by night blindness and visual field constriction. The X-linked form of RP (XLRP; MIM # 268000) is the most severe type of RP because of its early onset and its rapid progression. Five XLRP loci have been mapped: RP₂₃, RP₆, RP₃, RP₂, and RP₂₄. So far, only two XLRP genes have been identified: RPGR (for RP₃ locus)²⁵ and RP₂.²⁶

The pregnant woman underwent a chorionic biopsy because she was a carrier of a chromosomal mosaicism (45,X/46,XX). The cytogenetic results of the biopsy showed that the fetal karyotype was 46,XX, an obligatory carrier of the paternal mutation. The parents gave their consent for the study of the maternal plasma to be performed, knowing that it has only research and not diagnostic purposes.

MATERIALS AND METHODS

Family History and Patient

A pregnant woman at risk of carrying an affected fetus came to our hospital to undergo a chorion biopsy. She was a carrier of a mosaicism 45,X/46,XX. In addition, the father of the fetus was affected by XLRP due to a mutation in

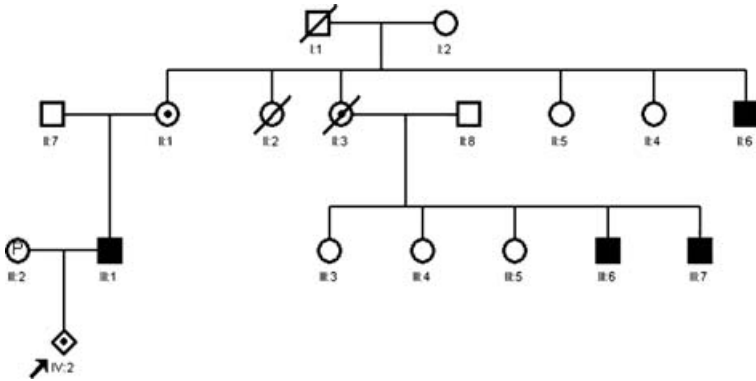


FIGURE 1. Genealogy of the family studied. The father of the fetus (■ III:1) was affected by an XLRP due to a mutation in the RP2 gene. He inherited the mutation from his mother (⊙II:1) who was a healthy carrier. ⊙: Pregnant woman. The arrow shows the *probandus* (fetus).

the RP2 gene (Q134X). He inherited this mutation from his mother, who was a healthy carrier (FIG. 1).

Blood Sample Collection

Blood samples were obtained from the pregnant woman with consent according to the Helsinki Declaration (1979). A total of 9 mL of maternal peripheral blood were collected in a tube with EDTA, at two different points of gestation (10th and 19th weeks). The first-trimester sample was taken just before the chorion biopsy. There was no opportunity to collect samples in between. Each tube was centrifuged at 1,500 *g* for 10 min at room temperature. One mL aliquot of plasma was centrifuged at 17,000 *g* for 10 min in an Eppendorf tube at room temperature. Supernatant (about 1 mL) was taken and stored in clean Eppendorf tubes at -20°C .

DNA Extraction

DNA was extracted from 2 mL of maternal plasma following the protocol of the QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with modifications. The elution process was performed twice using 50 μL of elution buffer. Samples were stored at -20°C .

DNA from the chorion villus sample (CVS) was extracted with the EZ1 DNA Tissue Kit, using the EZ1 Robot (Qiagen) in order to use it as fetal control.

The other DNAs used as controls (from the pregnant woman, the father, and the paternal grandmother) were already available because of a previous familial RP study.

PCR Amplification

RP2 gene comprises 5 exons and the mutation studied (Q134X) lies in the middle of exon 2.²⁷ A PCR assay was performed to amplify a 300-bp (base pair) region of this exon.

For each gestational age we used two different amounts of DNA (20 μ L and 30 μ L) as template and 2 μ L of DNA from the control samples. The final reaction mix had a volume of 50 μ L containing: 30 pmol of each primer (RP2-2b forward: 5'-CAT TGA TGA CTG TAC TAA CTG CAT-3'; RP2-2b reverse: 5'-CTG ACA CAG GTG TAA AGT CAT G-3') (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1 \times PCR buffer with 2.5mM MgCl₂ (Roche, Indianapolis, IN), 200 μ M of each deoxynucleotide, and 1U of FastStart Taq DNA Polymerase (Roche). Amplification was performed in a GeneAmp PCR System 2700 thermal cycler (Applied Biosystems). After an initial incubation at 94°C for 7 min, the reaction was cycled for 30 sec at 94°C, 45 sec at 61°C, and 1 min at 72°C, for 40 cycles, followed by a final extension of 7 min at 72°C. A total of 35 μ L of amplified PCR product was tested by electrophoresis in a 3% agarose gel and then purified using the QIAgen Purification Kit (Qiagen) with a final elution in 30 μ L of elution buffer.

Automated Sequencing

The sequencing reaction was carried out with 5 μ L of purified PCR product, 10 pmol of RP2-2b forward primer and dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommendations. Automated sequencing of the products was performed by the Sequencing Analysis program in the ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Restriction Analysis

The Q134X (c.400C>T) mutation creates a restriction site for *MseI*. In Q134X mutated sequences *MseI* breaks the 300-bp exon in two fragments of 146 bp and 154 bp each, whereas in wild-type sequences the enzyme does not fragment the exon. The digestion was carried out in a total volume of 37 μ L, containing 15 μ L amplified PCR product (300 bp), 40 U of *MseI* enzyme (Fermentas), 3.5 μ L of Buffer Enzyme R (10 mM Tris-HCl [pH 8.5], 10mM MgCl₂, 100mM KCl, 0.1 mg/mL BSA) (MBI Fermentas GMBH, St. Leon-Rot,

Germany), and 14.5 μ L of distilled water, and left overnight at 65°C. The digestion product was tested by an electrophoresis in a 9% acrylamide gel. To avoid the possibility of contamination in the loading gel process, plasma samples were separately loaded from control samples.

RESULTS

Sequencing analysis enabled the detection of the paternal mutation (Q134X) in the plasma sample. It was possible to observe at the mutation site the presence of a cytosine and a thymine. The cytosine corresponds to the wild-type X-chromosome whereas the thymine corresponds to the mutated X-chromosome. The presence of both nucleotides was also observed in the biopsy sample, confirming the results. The DNA sample of the paternal grandmother, used as healthy carrier control, revealed the presence of both nucleotides. The paternal sample, as hemizygous control, only showed the thymine at the mutation site (FIG. 2).

The sequencing analysis results were confirmed by restriction analysis. In the plasma sample three fragments of different sizes were observed: fragments of 146 bp and corresponding to the mutated X-chromosome, and a 300-bp fragment corresponding to the wild-type X-chromosome. The three bands were also observed in both the CVS and the grandmother's DNA. The paternal DNA showed the two bands corresponding to the mutated X-chromosome and the maternal DNA only showed the 300-bp band corresponding to the wild-type X-chromosome (FIG. 3).

None of the techniques revealed the presence of the mutation in the plasma sample from the 10th week of gestation. All the results were obtained in the 19th-week sample.

DISCUSSION

The aim of this study was to sequence a paternally inherited fetal mutation from maternal blood using automated sequencing.

The results of the automated sequencing presented here show that this technique allows the detection of the paternally inherited mutation in maternal plasma. The electropherogram showed the presence of a cytosine and a thymine at the same sequence site, showing the cytosine and the thymine corresponding to the wild-type X-chromosome and mutated X-chromosome, respectively. The presence of the thymine in the maternal blood can only be explained by its fetal origin. This clear detection demonstrates that paternally inherited fetal sequences or nucleotides, which are different from maternal ones, can be sequenced in maternal plasma. To our knowledge, there is only one report that has used DNA sequencing to analyze fetal DNA in maternal blood.²⁴



FIGURE 2. Sequencing analysis electropherograms. Cytosine and thymine at the mutation site, correspond to wild-type and mutated X-chromosomes, respectively. (A) Paternal DNA as hemizygous carrier of the mutation. Presence of thymine at the mutation site. (B) Grandmother's DNA as heterozygous carrier of the mutation. Presence of both cytosine and thymine at the mutation site. (C) Chorion villus DNA. Presence of both cytosine and thymine at the mutation site. (D) Plasma at 10th week of gestation (template of 20 µL). Presence of cytosine at the mutation site. (E) Plasma at 10th week of gestation (template of 30 µL). Presence of cytosine at the mutation site. (F) Plasma at 19th week of gestation (template of 20 µL). Presence of both cytosine and thymine at the mutation site. (G) Plasma at 19th week of gestation (template of 30 µL). Presence of both cytosine and thymine at the mutation site. (H) Maternal DNA. Presence of cytosine at the mutation site (homozygous wild type).

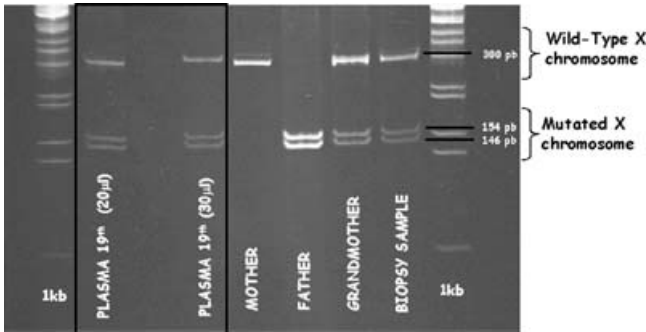


FIGURE 3. Results obtained from the restriction analysis. The 300-bp fragment corresponds to the wild-type X-chromosome and 154-bp and 146-bp fragments correspond to the mutated X-chromosome. *Lane 1:* 1 kb DNA Ladder (Lab Clinics) *Lane 2:* Plasma at 19th week of gestation (template of 20 μ L). Detection of 300-, 154-, and 146-bp fragments. *Lane 3:* Blank (no amplification) *Lane 4:* Plasma at 19th week of gestation (template of 30 μ L). Detection of 300-, 154-, and 146-bp fragments. *Lane 5:* Maternal DNA. Detection of 300-bp fragment. *Lane 6:* Paternal DNA as hemizygous carrier of the mutation. Detection of 154- and 146-bp fragments. *Lane 7:* Grandmother's DNA as heterozygous carrier of the mutation. Detection of 300-, 154-, and 146-bp fragments. *Lane 8:* Chorion villus DNA. Detection of 300-, 154-, and 146-bp fragments. *Lane 9:* 1 kb DNA Ladder (Lab Clinics).

The detection of point mutations by the use of restriction analysis has been widely described.^{14,15} In fact, it has been used in the present study in order to confirm the results obtained by sequencing analysis. However, these types of studies required a restriction site to be created or destroyed by the mutation. The advantage of sequencing analysis versus restriction analysis is that any kind of mutation at a nucleotide level can be studied by the use of this technique. The incorporation of sequencing analysis in diagnostic laboratories has represented a great advance in genetic testing because of its sensitivity and availability. The possible application of this technique in the analysis of fetal DNA present in maternal plasma samples would represent a step forward in noninvasive prenatal diagnosis and a perfect complement to the techniques already in use. These have been described as good tools for the prenatal diagnosis in maternal plasma.^{14,28–30}

In the 19th week plasma sample the paternally inherited mutation was undoubtedly detected. The proportion of fetal DNA present in the total amount was sufficient for a reliable diagnosis and the results are apparently independent of the quantity of template plasma DNA used in the PCR assay (20 and 30 μ L). However in the 10th week of gestation the mutation could not be detected. Previous studies have shown that there is an increase of the circulating fetal DNA throughout the gestation.^{17,18,31} The techniques used in this study have been shown to be sensitive enough, so the absence of results in the 10th week plasma sample would be due to a scarcity of circulating fetal DNA in maternal

blood. Nowadays, the tendency in conventional prenatal diagnosis is to have the results as soon as possible, which implies the performance of the analysis in the first trimester of gestation. This applies to noninvasive diagnosis as well. Li *et al.*³² have reported the detection of a paternally inherited fetal mutation in the first trimester of gestation using real-time PCR. So, further studies should be done in order to know whether the quantity of fetal DNA present in the sample taken in first trimester and beginning of second trimester is adequate to be used with all the techniques available including automated sequencing.

Being a prenatal diagnosis unit, we consider that reliability is very important. Previous works have detected the presence of fetal DNA from the 6th week of gestation¹⁸ and our group has reported the detection of fetal DNA from the 10th week of gestation.³⁰ However, detecting does not necessarily mean diagnostic capability in terms of reliability. The improvement of the DNA extraction, in order to decrease the maternal contamination, as well as the development of more sensitive techniques will mean the combination of both strategic points reliability and early detection.

This work opens up the possibility of incorporating automated DNA sequencing for the study of the fetal DNA present in maternal blood. To date, diverse techniques have been used for the detection of specific sequences on the circulating fetal DNA.^{9,14,28–30,33,34} However, the great advantage of automated DNA sequencing is that we can not only detect this DNA, but also enable its analysis at a nucleotide level.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank to Diego Cantalapiedra for his assistance. This work is supported by the Ministry of Health (PI040218). Ana Bustamante is supported by “Fundacion Conchita Rabago de Jimenez Diaz.”

REFERENCES

1. LO, Y.M. *et al.* 1997. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* **350**: 485–487.
2. CHIU, R.W. *et al.* 2001. Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin. Chem.* **47**: 1607–1613.
3. ANGERT, R.M. *et al.* 2003. Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: analysis of first- and third-trimester samples. *Clin. Chem.* **49**: 195–198.
4. DHALLAN, R. *et al.* 2004. Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. *JAMA* **291**: 1114–1119.
5. LI, Y. *et al.* 2004. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin. Chem.* **50**: 1002–1011.

6. LO, Y.M. *et al.* 1998. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.* **62**: 768–775.
7. PERTL, B. *et al.* 2000. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum. Genet.* **106**: 45–49.
8. GUIBERT, J. *et al.* 2003. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum. Reprod.* **18**: 1733–1736.
9. JOHNSON, K.L. *et al.* 2004. Interlaboratory comparison of fetal male DNA detection from common maternal plasma samples by real-time PCR. *Clin. Chem.* **50**: 516–521.
10. HARPER, T.C. *et al.* 2004. Use of maternal plasma for noninvasive determination of fetal RhD status. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **191**: 1730–1732.
11. GAUTIER, E. *et al.* 2005. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **192**: 666–669.
12. MOISE, K.J. 2005. Fetal RhD typing with free DNA in maternal plasma. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **192**: 663–665.
13. SAITO, H. 2000. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet* **356**: 1170.
14. GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, M.C. *et al.* 2002. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat. Diagn.* **22**: 946–948.
15. LI, Y. *et al.* 2004a. Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma—case report. *Prenat. Diagn.* **24**: 896–898.
16. WONG, B.C. & Y.M. LO, 2003. Cell-free DNA and RNA in plasma as new tools for molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **3**: 785–797.
17. BISCHOFF, F.Z. *et al.* 2005. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum. Reprod. Update* **11**: 59–67.
18. GALBIATI, S. *et al.* 2005. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum. Genet.* **117**: 243–248.
19. LO, Y.M. *et al.* 1999. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin. Chem.* **45**: 1747–1751.
20. SPENCER, K. *et al.* 2003. Increased total cell-free DNA in the serum of pregnant women carrying a fetus affected by trisomy 21. *Prenat. Diagn.* **23**: 580–583.
21. WATAGANARA, T. 2003. Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. *Hum. Genet.* **112**: 204–208.
22. LO, Y.M. *et al.* 1999b. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin. Chem.* **45**: 184–188.
23. ZHONG, X.Y. *et al.* 2001. Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **184**: 414–419.
24. POON, L.L. *et al.* 2002. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* **48**: 35–41.
25. MUSARELLA, M.A. *et al.* 1988. Localization of the gene for X-linked recessive type of retinitis pigmentosa (XLRP) to Xp21 by linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* **43**: 484–494.
26. BHATTACHARYA, S.S. *et al.* 1984. Close genetic linkage between X-linked retinitis pigmentosa and a restriction fragment length polymorphism identified by recombinant DNA probe L1.28. *Nature* **309**: 253–255.

27. SCHWAHN, U. *et al.* 1998. Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. *Nat.Genet.* **19**: 327–332.
28. GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, M.C. *et al.* 2003. Huntington disease-affected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat. Diagn.* **23**: 232–234.
29. GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, M.C. 2003. Early Huntington disease prenatal diagnosis by maternal semiquantitative fluorescent PCR. *Neurology* **60**: 1214–1215.
30. GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, M.C. 2005. Application of fetal DNA detection in maternal plasma: a prenatal diagnosis unit experience. *J. Histochem. Cytochem.* **53**: 307–314.
31. BIANCHI, D.W. 2004. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential—a review. *Placenta* **25**(Suppl. A): S93–S101.
32. LI, Y. *et al.* 2005. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA* 2005 **293**: 843–849.
33. HROMADNIKOVA, I. *et al.* 2003. Replicate real-time PCR testing of DNA in maternal plasma increases the sensitivity of non-invasive fetal sex determination. *Prenat. Diagn.* **23**: 235–238.
34. HO, S.S. *et al.* 2004. Non-invasive prenatal diagnosis of fetal gender using real-time polymerase chain reaction amplification of SRY in maternal plasma. *Ann. Acad. Med. Singapore* **33**(Suppl. 5): S61–S62.

4.6 Determinación del sexo fetal en sangre materna a partir de la séptima semana de gestación. Implicación clínica en gestantes portadoras de hemofilia

Ana Bustamante-Aragonés, Marta Rodríguez de Alba, Cristina González-González, María José Trujillo-Tiebas, Dan Diego-Álvarez, Elena Vallespín, Javier Plaza, Carmen Ayuso, Carmen Ramos

Haemophilia (2008) 14:593-598

Uno de los primeros diagnósticos derivados del descubrimiento de ADN fetal en sangre materna fue la posibilidad de determinar el sexo fetal a partir de la detección de secuencias específicas del cromosoma Y. Este diagnóstico cobra especial importancia en fetos con riesgo de padecer alguna enfermedad ligada al cromosoma X como puede ser la hemofilia.

El objetivo de este estudio es validar este método de determinación del sexo fetal y testar su aplicabilidad clínica mediante el diagnóstico de 15 fetos de madres portadoras de hemofilia. Para el estudio de validación se testaron 316 muestras de plasma materno recogidas entre la semana 5ª y 12ª de gestación procedentes de 196 gestaciones diferentes. Tras el estudio de validación se analizaron 15 gestaciones con riesgo de portar un feto hemofílico.

Mediante este método de análisis de ADN fetal en plasma materno, el sexo fetal fue correctamente diagnosticado en todas las gestaciones analizadas en el estudio de validación. La eficacia y especificidad del método fue del 100% a partir de la séptima semana de gestación. En las 15 gestaciones con riesgo de portar un feto hemofílico, el sexo fetal fue también correctamente diagnosticado.

La determinación del sexo fetal en sangre materna a partir de la séptima de gestación es un diagnóstico actualmente disponible en nuestro hospital debido a la alta eficacia del método tras el estudio de validación. La correcta determinación del sexo fetal en sangre materna de portadoras de hemofilia limitaría la necesidad de realización de un diagnóstico prenatal invasivo a gestaciones de fetos varón.

ORIGINAL ARTICLE *Women with bleeding disorders*

Foetal sex determination in maternal blood from the seventh week of gestation and its role in diagnosing haemophilia in the foetuses of female carriers

A. BUSTAMANTE-ARAGONES,* M. RODRIGUEZ DE ALBA,* C. GONZALEZ-GONZALEZ,* M. J. TRUJILLO-TIEBAS,* D. DIEGO-ALVAREZ,* E. VALLESPIN,* J. PLAZA,† C. AYUSO* and C. RAMOS*

*Department of Genetics, Fundacion Jimenez Diaz-Capio, CIBERER, Madrid, Spain; and †Department of Obstetrics and Gynaecology, Fundacion Jimenez Diaz-Capio, Madrid, Spain

Summary. The existence of foetal DNA in maternal blood, discovered in 1997, opened new possibilities for noninvasive prenatal diagnosis. This includes foetal sex assessment by the detection of specific Y chromosome sequences in maternal blood, particularly important when a foetus may be affected by an X-linked disorder such as haemophilia. This study aims to validate this sex assessment method and to test its clinical utility in the diagnosis of 15 potentially affected pregnancies in female carriers of haemophilia. In the validation study, 316 maternal blood samples from 196 pregnant women at gestations ranging from 5 weeks to 12 weeks were analysed. In the clinical study, 15 pregnancies at risk of having a haemophilic foetus were tested. All pregnancies in the validation study were correctly diagnosed. The

accuracy and specificity of the methodology from the seventh week of gestation was 100%. The sex of all 15 pregnancies identified as being at risk of bearing a haemophilic foetus was correctly diagnosed. Foetal sex assessment by detecting specific Y chromosome sequences in maternal blood is now routinely used in our hospital because of its high accuracy from the seventh week of gestation. Reliable foetal gender determination from maternal blood of pregnant women carriers of haemophilia in the first trimester of gestation can avoid more conventional, invasive methods of prenatal diagnosis.

Keywords: clinical routine, foetal DNA, haemophilia, maternal blood, noninvasive prenatal diagnosis

Introduction

Haemophilia is an X-linked disorder causing severe coagulation deficiencies. It is caused by mutations in FVIII or FIX genes located on the X chromosome. Being an X-linked disease, it affects mainly men. Women carrying the defect on one X-chromosome are not haemophiliacs clinically, but as carriers they may pass the mutation on to their children, potentially producing affected male and carrier female offspring.

Genetic testing and genetic counselling is recommended for families with haemophilia and prenatal diagnosis is recommended for pregnancies in which the mother is a carrier of haemophilia. However, currently, invasive obstetrical procedures are required for prenatal diagnosis and involve a miscarriage rate of 0.5–1% or higher.

In 1997, Lo [1] discovered the presence of circulating cell-free foetal DNA (ccffDNA) in maternal blood by detecting Y-chromosome-specific sequences in male-bearing pregnancies. Some of the studies that have been carried out using ccffDNA are foetal sex determination [2–5], foetal RH determination [6–8] and the detection of foetal genetic diseases [9–12] and foetal aneuploidies [13,14]. ccffDNA forms a small percentage of the total DNA present in plasma samples (3–6%) [15] but levels rise during gestation [16] and it is rapidly cleared from the

Correspondence: Ana Bustamante-Aragones, Department of Genetics, Fundacion Jimenez Diaz-Capio, CIBERER, Avda. Reyes Catolicos 2. 28040, Madrid, Spain.
Tel.: +34 91 550 4872; fax: +34 91 544 8735;
e-mail: abustamante@fd.es

Accepted after revision 26 January 2008

maternal circulation within hours of delivery [17,18].

Studies involving foetal gender determination in maternal blood are based on the presence or absence of foetal Y chromosome sequences in maternal blood. Early identification of foetal gender is important for couples at risk of having a foetus affected by an X-linked disorder, such as haemophilia. Early diagnosis means pregnant women carrying a female foetus could avoid later invasive prenatal testing and male foetuses could have an early chorion villous sampling (CVS).

Foetal sex assessment from maternal blood samples has widely been described in research studies [2–5], however, to the best of our knowledge; there is little evidence of its incorporation to the clinical practice. With this aim, we undertook a large-scale validation study of this practice. In this work, we present the results of both the validation study performed to introduce this methodology to the routine clinical practise of our hospital as well as its first application in identifying sex in foetuses at high risk for haemophilia.

Materials and methods

Sample collection

For the preliminary validation study, 196 pregnant volunteers participated. Maternal blood samples from gestations ranging from 5 to 12 weeks were collected to determine the most appropriate week to perform the test. In total, 316 plasma samples were analysed that included in some instances a second and third blood sample to confirm the result. Other confirmation methods used were conventional prenatal genetic testing, ultrasound scan, or clinical diagnosis at birth.

Following the validation study, the technique was introduced into clinical practice in our hospital and offered to pregnant women at high risk of having a foetus affected with an X-linked disorder. Fifteen pregnancies were identified as being at risk of haemophilia. Two blood samples were taken from these pregnancies, one from the seventh week of gestation and the other from 9 weeks of gestation.

Sample processing and DNA extraction

Twenty millilitres of maternal peripheral blood was collected in tubes with Ethylene diamine Tetra-acetic acid (EDTA) anticoagulant following informed consent and in accordance with the Helsinki Declaration. Samples were processed within 24 h of blood collec-

tion. Processing was carried out by female personnel to avoid contamination with male genetic material. Specimens were centrifuged at 1600 g for 10 min at room temperature in the original collection tube. Plasma was collected, divided in 1 mL aliquots and centrifuged at 13 000 g for 10 min. The supernatant was removed from each aliquot and placed in new collection tubes and stored at -20°C .

An aliquot of 1 mL of plasma sample was used for DNA extraction. Samples were thawed at room temperature and DNA was extracted using the QIAamp DNA blood Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) according to the protocol previously described [16]. DNA was eluted in 50 μL of elution buffer (provided in the kit).

Real-time PCR

Foetal sex assessment was based on detecting the presence of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY gene). In addition, the glyceraldehyde phosphate dehydrogenase gene (GAPDH gene) was used to have a control for the DNA extraction process and polymerase chain reactions (PCR). Both targets were analysed independently in singleplex reactions to prevent outcompetition of the SRY amplification.

Each sample was tested three times for the SRY gene and twice for the GAPDH gene. In each replicate, 8 μL of DNA extracted from the plasma sample was used. A sample of male genomic DNA and a female genomic DNA was included in the PCR as controls. For these samples, only 1 μL of genomic DNA was used for the PCR amplification.

All reactions were carried out in a final volume of 25 μL . Reactions for the SRY amplification contained 300 nmol of the forward primer (SRY-F: 5'-GCGACCCATGAACGCATT-3'), 900 nmol of the reverse primer (SRY-R: 5'-GCCATCTTGCCCTCTGA-3'), 200 nmol of the *Taqman* probe (SRY-P: 6-FAM-CGTGTGGTCTCGCG-MGB) and 12.5 μL of *Taqman* Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reactions for the GAPDH amplification contained 300 nmol of each primer (forward primer GAPDH-F: 5'-CCCCACACACATGCACTTACC-3' and reverse primer GAPDH-R: 5'-CCTAGTCCCAGG-GCTTTGATT-3') and 200 nmol of the *Taqman* probe (GAPDH-R: VIC-AAAGAGCTAGGAAGGACAGGCAACTTGGC-TAMRA) and 12.5 μL of *Taqman* Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Thermal cycling was initiated with 2 min incubation at 50°C , followed by a first denaturation phase at 95°C for 10 min and

then 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. All probes and primers were supplied by Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Amplification data were collected and analysed with an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Results

Large-scale validation study

Foetal gender was determined in each sample by the presence or absence of the SRY sequence amplification. The foetus was considered to be a male only if the SRY sequence was detected in all three replicates; likewise a diagnosis of female sex required the absence of SRY amplification in all replicates (Fig. 1). Samples where the replicates were not concordant for SRY amplification were re-analysed.

When analysing the two blood samples of a pregnant woman a discord in the foetal sex assessment was found, a third blood sample was taken at the 11th week of gestation.

Of the 196 pregnant women enrolled in the validation study, 96 were shown to be carrying male foetuses on the basis of PCR amplification of the SRY locus in the plasma sample. The 100 remaining gestations were interpreted as female-bearing pregnancies based on the absence of the SRY sequence amplification. These results were confirmed either by conventional prenatal diagnosis or at birth. All pregnancies were correctly diagnosed by our analysis of maternal plasma.

A total of 316 samples ranging from 5 to 12 weeks of gestation were studied. Sampling at a range of different gestational ages was performed to determine the most appropriate week to perform the test. The accuracy and sensitivity of the method was

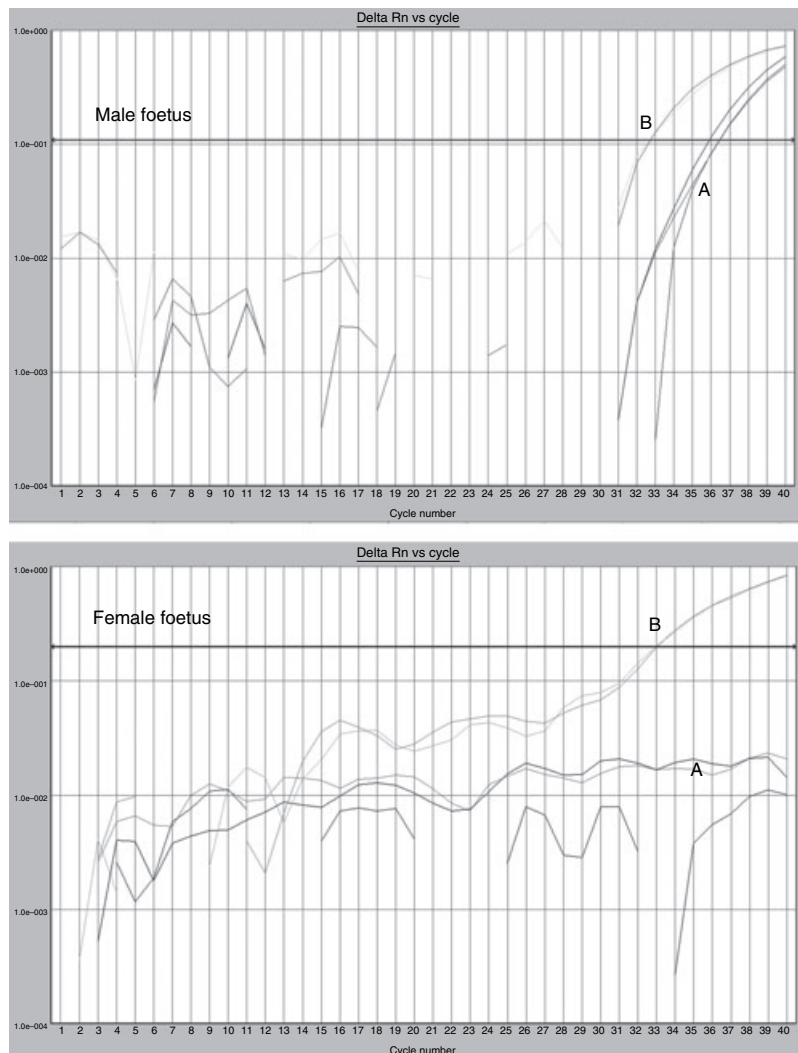


Fig. 1. Amplification plots of a male and a female foetus. (a) Amplification plot of the three replicates where SRY is studied. There is only amplification when the foetus is a male. (b) Amplification plot of the two replicates where GAPDH is studied. There is amplification both when the foetus is female or male.

Table 1. Statistical parameters of the validation study.

Gestational Age (weeks)	5	6	7	8	9	10	11	12
Samples analysed (<i>n</i> = 316)	11	22	27	54	58	55	58	31
Female foetuses (<i>n</i> = 155)	7	4	17	28	29	23	28	19
Male Foetuses (<i>n</i> = 161)	2	14	10	26	29	32	30	12
False negatives	2	4	0	0	0	0	0	0
Sensitivity ^a (%)	50	77	100	100	100	100	100	100
Specificity ^b (%)	100	100	100	100	100	100	100	100
PPV ^c (%)	100	100	100	100	100	100	100	100
NPV ^d (%)	78	50	100	100	100	100	100	100
Accuracy ^e (%)	81	81	100	100	100	100	100	100

Results obtained at the different gestational ages tested.

Sensitivity: number of male-bearing samples correctly identified/total number of male-bearing samples tested.

Specificity: number of female-bearing samples correctly identified/total number of female-bearing samples tested.

Positive Predictive Value (PPV): number of male-bearing samples correctly identified/total number of positive results at real-time PCR.

Negative Predictive Value (NPV): number of female-bearing samples correctly identified/total number of negative results at real-time PCR.

Accuracy: total number of male- and female-bearing samples correctly identified/total number of samples tested.

100% in all samples collected from the seventh week of gestation. However, in earlier gestational ages, the accuracy and sensitivity were lower (Table 1). Misdiagnosis was found in six of the samples collected at the earliest gestational ages analysed (fifth and sixth week of gestation). This misdiagnosis entirely consisted of the incorrectly identification of male foetuses because of the non-detection of the SRY sequence (false negatives; Table 1). The presence of the amplification of every control used in each PCR reaction revealed that the no-detection of the SRY gene in these cases was because of the scarcity of ccffDNA in the sample and not because of a failure in the technique. No false positives (detection of the Y-chromosome specific sequence in samples collected from female-bearing pregnancies) occurred.

Clinical diagnosis in pregnant women carriers of haemophilia

A total of 15 pregnancies at high risk of having an affected foetus with haemophilia were identified and tested once the method was introduced as a routine clinical test. In these cases, a sample was collected from the seventh week of gestation and again at the 8 or 9 weeks of gestation. Both samples studied for each case were concordant, revealing that 11 were male-bearing pregnancies and four female-bearing (Table 2). All foetuses were correctly diagnosed.

Discussion

Noninvasive foetal sex determination based on the identification of ccffDNA in maternal blood provides a safe alternative to conventional invasive genetic studies of the foetus. Foetal sex assessment from

Table 2. Foetal sex diagnosis in pregnant women carriers of Haemophilia.

Pregnant woman	Gestational age of		SRY detection in		Foetal sex diagnosed
	Sample 1s (week days)	Sample 2 (week days)	Sample 1	Sample 2	
1	7	9 ⁺⁴	Yes	Yes	Male
2	10 ⁺⁴	11 ⁺²	No	No	Female
3	11 ⁺²	12 ⁺¹	Yes	Yes	Male
4	7 ⁺⁵	9 ⁺⁵	Yes	Yes	Male
5	7 ⁺¹	9 ⁺¹	Yes	Yes	Male
6	8	10	Yes	Yes	Male
7	10 ⁺²	12	Yes	Yes	Male
8	7	9	Yes	Yes	Male
9	7	9	Yes	Yes	Male
10	7 ⁺⁴	9 ⁺³	Yes	Yes	Male
11	8	9 ⁺⁵	No	No	Female
12	7 ⁺²	9 ⁺²	No	No	Female
13	8	9 ⁺⁵	Yes	Yes	Male
14	10	11	Yes	Yes	Male

maternal blood has been extensively researched [2–5]. Knowledge of foetal gender is useful for pregnancies at high risk of having a foetus affected with an X-linked disorder, such as haemophilia [19]. At present, at-risk couples have to undergo invasive obstetric procedures to ascertain the affected/non-affected condition of the foetus.

We performed a preliminary, large-scale validation study of a method for diagnosing foetal sex based on ccffDNA in maternal blood and then applied this method clinically for pregnancies at risk of haemophilia.

The validation study involving maternal blood samples collected in the first trimester of gestation revealed a 100% accuracy and sensitivity from the seventh week of gestation. The high accuracy makes this approach appropriate for clinical diagnosis at

this stage of gestation. However, in earlier gestational ages a small number of false negatives, with male fetuses incorrectly identified as female, occurred. The absence of the SRY sequence amplification in samples collected in the fifth and sixth week of male-bearing pregnancies was attributed to the low levels of cffDNA in the maternal blood at these gestational ages [15,16].

Once the method was introduced into routine clinical practice at our hospital, it was offered to pregnant women at risk of having foetus affected with an X-linked disorder. Samples were collected from 15 women at risk of carrying a foetus with haemophilia. In all cases, the two blood samples collected were concordant; therefore a reliable diagnosis could be made. Subsequent conventional prenatal diagnosis or foetal ultrasonography revealed that all fetuses were correctly diagnosed.

In at-risk pregnancies in which a male foetus is detected, conventional prenatal diagnosis is recommended, and early sex determination allows early chorion biopsy and genetic testing of male fetuses. In pregnancies where the foetus is female, the pregnant woman can avoid invasive testing and its risk of foetal mortality because the foetus would be, at worst, a carrier of the disease. The understanding of this early noninvasive prenatal diagnosis in the haemophilia units has increased its demanding from the carrier pregnant women.

Moreover, it is a feasible, rapid (studies can be performed in 5 h) and low cost approach. Samples can be sent at room temperature in the 24 h following collection without influencing the diagnosis. This allows samples from different hospitals to be sent via courier to a diagnostic laboratory. A limitation of this diagnosis is that trained personnel are required and preferably female personnel to avoid possible male contamination. The incorporation of this method in different laboratories would allow comparative studies of its accuracy and it would support the incorporation of this diagnosis in the global clinical practice of Haemophilia.

In conclusion, this work shows the high accuracy of the foetal sex determination in maternal blood from the seventh week of gestation. First applications in pregnant women carriers of Haemophilia reveal that the early and safe foetal sex diagnosis provided by this practice represents a great advantage for these pregnancies. Since the CVS is performed from the 10th week of gestation and this method is being established to be performed before it, we would suggest performing this study with a first sample collected at the eighth week and a second sample at 10 weeks of gestation.

Acknowledgements

Thanks to Almudena Avila, Rocio Cardero and Fernando Infantes for their participation in the validation study; to Diego Cantalapiedra for his assistance; and to all participating women for their collaboration. This work is supported by the Ministry of Health (PI040218). Ana Bustamante is supported by 'Fundacion Conchita Rabago de Jimenez Diaz'.

Disclosures

The authors stated that they had no interests which might be perceived as posing a conflict or bias.

References

- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; **350**: 485–7.
- Ho SS, Damayanti Z, Chua WY *et al.* Non-invasive prenatal diagnosis of fetal gender using real-time polymerase chain reaction amplification of SRY in maternal plasma. *Ann Acad Med Singapore* 2004; **5**(Suppl.): S61–2.
- Johnson KL, Dukes KA, Vidaver J *et al.* Interlaboratory comparison of fetal male DNA detection from common maternal plasma samples by real-time PCR. *Clin Chem* 2004; **50**: 516–21.
- Avent ND, Chitty LS. Non-invasive diagnosis of fetal sex; utilisation of free fetal DNA in maternal plasma and ultrasound. *Prenat Diagn* 2006; **26**: 598–603.
- Tachdjian G, Frydman N, Audibert F *et al.* Clinical applications of fetal sex determination in maternal blood in a preimplantation genetic diagnosis centre. *Hum Reprod* 2002; **17**: 2183–6.
- Harper TC, Finning KM, Martin P, Moise KJ Jr. Use of maternal plasma for noninvasive determination of fetal RhD status. *Am J Obstet Gynecol* 2004; **191**: 1730–2.
- Gautier E, Benachi A, Giovangrandi Y *et al.* Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am J Obstet Gynecol* 2005; **192**: 666–9.
- Moise KJ. Fetal RhD typing with free DNA in maternal plasma. *Am J Obstet Gynecol* 2005; **192**: 663–5.
- Gonzalez-Gonzalez MC, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ *et al.* Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002; **22**: 946–8.
- Li Y, Holzgreve W, Page-Christiaens GC, Gille JJ, Hahn S. Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma-case report. *Prenat Diagn* 2004; **24**: 896–8.

- 11 Gonzalez-Gonzalez C, Garcia-Hoyos M, Trujillo-Tiebas MJ *et al.* Application of fetal DNA detection in maternal plasma: a prenatal diagnosis unit experience. *J Histochem Cytochem* 2005; **53**: 307–14.
- 12 Bustamante-Aragones A, Garcia-Hoyos M, Rodriguez de Alba M *et al.* Detection of a paternally inherited fetal mutation in maternal plasma by the use of automated sequencing. *Ann N Y Acad Sci* 2006; **1075**: 108–17.
- 13 Dhallan R, Guo X, Emche S *et al.* A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet* 2007; **10**: 369.
- 14 Lo YM, Tsui NB, Chiu RW *et al.* Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 2007; **13**: 218–23.
- 15 Lo YM, Tein MS, Lau TK *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.
- 16 Galbiati S, Smid M, Gambini D *et al.* Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum Genet* 2005; **117**: 243–8.
- 17 Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999; **64**: 218–24.
- 18 Ng EK, Tsui NB, Lau TK *et al.* mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 4748–53.
- 19 Santacroce R, Vecchione G, Tomaiuolo M *et al.* Identification of fetal gender in maternal blood is a helpful tool in the prenatal diagnosis of haemophilia. *Haemophilia* 2006; **12**: 417–22.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSSION

El diagnóstico prenatal no invasivo a partir de sangre materna es un gran reto dentro de la medicina fetal. Hace unos años, este diagnóstico pertenecía exclusivamente al ámbito científico y tenía una posición bastante alejada de la práctica clínica. Sin embargo, hoy en día esto ha cambiado y, gracias al vertiginoso avance de la biología molecular, el DPNI está empezando a formar parte de las unidades de diagnóstico prenatal en algunos países. Sin embargo, aún queda un largo camino recorrer ya que, por el momento, sólo la determinación del sexo fetal y del factor Rh han sido trasladados a la clínica.

El presente trabajo consta de dos apartados diferentes: una primera parte en la que se muestra el estudio prenatal, en plasma materno, de defectos genéticos de herencia paterna asociados a diferentes enfermedades monogénicas, y una segunda parte en la que se muestra la incorporación a la práctica clínica del diagnóstico prenatal del sexo fetal en plasma materno.

5.1. Estudio de enfermedades monogénicas

Actualmente el diagnóstico prenatal de enfermedades monogénicas se ofrece a aquellas parejas en las que existe un alto riesgo para el feto de alguna de estas enfermedades, debido al carácter portador, previamente caracterizado, de los padres. También el estudio ecográfico puede inducir a la sospecha de la existencia de un defecto genético *de novo* en el feto, como por ejemplo en el caso de las displasias óseas, situación en la que también se ofrecería la posibilidad de realizar un estudio prenatal. En ambos casos el diagnóstico prenatal actual requiere el empleo de técnicas obstétricas invasivas las cuales conllevan un riesgo de pérdida fetal que oscila entre el 0,5 – 3%.

El DPNI tiene como finalidad la posibilidad de realizar estos estudios a partir del estudio de ADN fetal presente en plasma materno, lo que suprimiría el riesgo asociado al diagnóstico prenatal invasivo. Como se ha descrito previamente, la presencia de ADN materno en la muestra de plasma limita el DPNI de enfermedades monogénicas al estudio de defectos genéticos de herencia paterna o *de novo*. Al estar basado este diagnóstico en un criterio de exclusión, la ausencia del

defecto genético en el plasma materno sería reflejo de la ausencia de dicho defecto en el feto.

La incorporación al estudio del ADN fetal en plasma materno de las nuevas tecnologías emergentes en el campo de la biología molecular, las cuales suelen ir asociadas, entre otros, a una mayor sensibilidad de detección, aumenta el abanico de posibilidades diagnósticas del DPNI (Norbury y cols., 2008). La búsqueda de técnicas que permitan un diagnóstico fiable, rápido y no muy costoso, mediante el estudio de plasma materno, representaría un gran avance dentro del diagnóstico prenatal. Además, la posibilidad de realizar este diagnóstico de manera precoz, en el primer o segundo trimestre de gestación, es fundamental al tratarse de un estudio prenatal.

El presente trabajo muestra el diagnóstico de cinco enfermedades monogénicas diferentes mediante la aplicación de distintas técnicas moleculares, algunas de las cuales no habían sido previamente utilizadas en el estudio de ADN fetal libre en plasma materno. Se han estudiado enfermedades de herencia dominante, recesiva y ligada a cromosoma X.

5.1.1 Enfermedad monogénica dominante

En parejas en las que el varón es portador de un defecto genético asociado a una enfermedad con patrón de herencia dominante, la detección o exclusión de dicho defecto en el plasma materno diagnosticaría al feto como enfermo o sano para dicha enfermedad. Lo mismo ocurriría con la exclusión de un defecto genético *de novo* con patrón de herencia dominante sospechado por ecografía (como por ejemplo en el caso de la acondroplasia). En este trabajo se muestra el diagnóstico de la enfermedad de Huntington (enfermedad con patrón de herencia dominante) en cuatro fetos con riesgo de padecer la enfermedad.

5.1.1.1 Diagnóstico prenatal de corea de Huntington

En el año 2003 González-González y cols., publicaron el diagnóstico de un feto sano y de un feto enfermo de corea de Huntington a partir del estudio de ADN fetal en plasma materno (González-González y cols., 2003a; 2003b). Ambos estudios se basaron en el análisis directo del número repeticiones del triplete CAG implicado en la enfermedad mediante QF-PCR. Hasta la fecha, estos dos trabajos de nuestro grupo eran los únicos que habían descrito el diagnóstico prenatal de esta enfermedad a partir del estudio de plasma materno.

En el presente trabajo se muestra el estudio de cuatro nuevos fetos con riesgo de padecer corea de Huntington (apartado 4.1; Bustamante-Aragones y cols., 2008d). Además de apoyar los estudios previamente publicados por González-González, este trabajo incorpora un doble abordaje diagnóstico, el estudio directo de las repeticiones CAG y el estudio indirecto mediante un marcador microsatélite, siguiendo las pautas que se llevan a cabo en el laboratorio para el diagnóstico de esta enfermedad y que cumplen las directrices europeas.

Como se ha comentado anteriormente, una de las limitaciones del diagnóstico prenatal a partir de ADN fetal en plasma materno es que este ADN se encuentra fragmentado y, en consecuencia, su tamaño es menor. Esta característica limita el diagnóstico a fragmentos de ADN que no tengan gran longitud. En el caso del corea de Huntington, al tratarse de una enfermedad originada por una mutación dinámica, hemos observado la dificultad de detectar grandes expansiones mediante el estudio directo de la región mutada a partir de plasma materno. Esto se muestra en la no detección, mediante el estudio directo del triplete CAG, de un alelo fetal de 114 repeticiones en uno de los casos estudiados. Sin embargo, esto no representa una gran limitación para este método dado que la frecuencia de expansiones tan largas asociadas al corea de Huntington de inicio precoz es muy baja (Nance y cols., 2001). Para estos casos de inicio precoz, la implementación del estudio indirecto mediante marcadores microsatélites, solventaría esta limitación.

Por otro lado, el estudio directo de las repeticiones CAG ha permitido la detección de un alelo fetal expandido (con 42 repeticiones) en una muestra de

plasma materno de 6 semanas de gestación. Este resultado tiene una gran relevancia porque es la detección más precoz, reportada hasta el momento, de un alelo mutado responsable de corea de Huntington en plasma materno y demuestra la temprana edad gestacional en la que podrían llevarse a cabo estos estudios.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, el método directo presenta una mayor eficacia diagnóstica que el estudio indirecto mediante el marcador I1CAHD-2. Considerando las semejanzas en cuanto a escasez de muestra de partida, entre el diagnóstico prenatal no invasivo y el diagnóstico preimplantacional, se eligió este marcador siguiendo un trabajo publicado sobre el estudio genético preimplantacional de corea de Huntington (Moutou y cols, 2004). En dicho trabajo los autores definen el marcador I1CAHD-2 como el microsatélite más informativo y cercano al gen *IT15*. Sin embargo, aunque este microsatélite resulta muy útil para el diagnóstico preimplantacional como se muestra en el trabajo de Moutou y cols., su carácter dinucleótido dificulta mucho el análisis del ADN fetal en plasma materno; la menor concentración en la que se encuentra el ADN fetal no permite diferenciar, en muchos casos, el alelo fetal de las comúnmente conocidas “bandas fantasmas” del alelo materno. Por ello proponemos la utilización de otro marcador microsatélite, preferentemente no dinucleótido, para realizar posteriores estudios indirectos de esta enfermedad.

Paralelamente, el estudio de ADN fetal en plasma materno podría ser una herramienta útil para la confirmación de la implantación de embriones sanos tras un estudio genético preimplantacional de Corea de Huntington.

La necesidad de que el progenitor portador de la enfermedad sea el padre del feto no representaría una gran limitación en el diagnóstico de corea de Huntington dado que, según la experiencia previa de nuestro laboratorio, el 80-90 % de los casos de diagnóstico prenatal acuden por un varón portador de la mutación. Es por ello que el DPNI tiene un alto potencial diagnóstico para esta enfermedad ya que sería aplicable a este alto porcentaje de casos.

Aunque se necesita el estudio de mayor número de muestras para poder concluir si este abordaje es eficaz para el estudio de corea de Huntington, nuestros resultados

apoyan los dos trabajos anteriores que plantean esta hipótesis (González-González y cols. 2003a; 2003b) además de evidenciar la temprana edad gestacional en la que podría realizarse este diagnóstico (6 semanas).

5.1.2 Enfermedades monogénicas recesivas

En el caso de enfermedades con un patrón de herencia recesiva, el DPNI representa un beneficio para aquellas parejas en las que ambos miembros portan una mutación diferente, previamente caracterizada, y asociada a la misma enfermedad.

El DPNI ofrece la posibilidad de estudiar el defecto genético portado por el padre en el plasma materno. Mediante la detección o exclusión de dicho defecto, se limitaría la necesidad del diagnóstico prenatal invasivo a los casos en los que el defecto paterno hubiese sido heredado por el feto. En el caso de que la mutación paterna no hubiese sido heredada, el feto sería, en el peor de los casos, portador del defecto materno y, por tanto, las pruebas invasivas serían innecesarias. Por tanto, el estudio de la mutación en el plasma materno eliminaría el riesgo de pérdida fetal asociado a las técnicas obstétricas invasivas en el 50% de las gestaciones en los que los padres son portadores de mutaciones diferentes asociadas a una enfermedad recesiva. Según la enfermedad de estudio, la heterogeneidad mutacional poblacional será variable. Este parámetro influye directamente sobre la aplicabilidad del DPNI dado que a mayor heterogeneidad, mayor será el potencial clínico del método.

En este trabajo se presenta el diagnóstico de tres enfermedades diferentes con herencia autosómica recesiva: Amaurosis Congénita de Leber (LCA), Fibrosis Quística (FQ) y Acidemia Propiónica (AP). Todos los diagnósticos se realizaron en muestras de plasma materno recogidas en el primer trimestre de gestación dado que al tratarse de un diagnóstico prenatal, la precocidad de los resultados es fundamental. Tanto el diagnóstico de LCA como de AP son nuevos en el campo del DPNI. Además en estos diagnósticos se han incorporado dos técnicas nuevas en el campo del DPNI, el dHPLC y la minisequenciación.

5.1.2.1 Diagnóstico prenatal de amaurosis congénita de Leber

Este trabajo presenta la primera evidencia de la detección en plasma materno una mutación fetal asociada a LCA (apartado 4.2; Bustamante-Aragones y cols., 2008e). Otra de las novedades que incorpora el estudio es la técnica analítica empleada: el dHPLC.

La técnica de dHPLC se emplea actualmente en nuestro laboratorio como método de *screening* de mutaciones para el diagnóstico genético de diversas enfermedades (Valverde y cols., 2007; Aguirre-Lamban y cols., 2008). Su sencillez y fiabilidad fueron parámetros considerados a la hora de ser testada para el estudio del ADN fetal en plasma materno.

Para este trabajo fue fundamental el diseño de una batería de diluciones seriadas de ADN mutado (ADN paterno) en ADN control (*wild-type*). El estudio de estos controles con diferentes porcentajes de ADN mutado permitió conocer el límite de detección del dHPLC para la mutación de estudio (que se estableció en el 2%) e inferir la presencia de la mutación fetal en la muestra de plasma. Fue, pues, un abordaje eficaz para determinar la condición portadora del feto para la mutación de estudio.

Además, a partir de la comparación del patrón presentado por las diferentes diluciones y la muestra de plasma materno, se estimó que la cantidad de ADN fetal presente en la muestra estudiada representaba aproximadamente el 5-2% del ADN total. Estos valores son semejantes a los descritos previamente por diversos autores (Lo y cols., 1998; Angert y cols., 2003; Galbiati y cols., 2005). Aunque este diseño experimental, basado en la creación de diluciones seriadas, podría ser una herramienta útil para estimar el porcentaje de ADN fetal presente en una muestra de plasma materno, no sería un método apropiado para realizar una cuantificación absoluta.

Además de la técnica de dHPLC también se estudió la muestra mediante la técnica de secuenciación automática, aunque ésta no resultó eficaz en la detección de la mutación fetal. Según los resultados obtenidos en este caso y en el caso del

apartado 5.1.3.1, y como se discutirá más adelante, la técnica de secuenciación automática podría estar limitada al estudio de muestras de plasma materno recogidas a partir del segundo trimestre de gestación debido a la existencia de mayor cantidad de ADN fetal.

La heterogeneidad mutacional del gen *CRB1* es muy alta, siendo las mutaciones en este gen responsables de más del 20 % de los pacientes LCA en población española (Vallespin y cols., 2007). Esta alta variedad mutacional de la enfermedad hace que la posibilidad de realizar un DPNI sea muy factible. A pesar de ello, la baja incidencia poblacional de LCA (2-3:100000 nacidos vivos) ralentiza la recogida de casos a estudiar y, por lo tanto, la validación del método para el diagnóstico de esta enfermedad.

El estudio de mayor número de casos validaría la utilidad de la técnica para la detección de mutaciones fetales en plasma materno. Aunque en el caso presentado en este trabajo se ha detectado la mutación fetal mediante el empleo del dHPLC, hay que considerar que esta técnica puede presentar eficacias de detección diferentes para mutaciones y fragmentos genómicos distintos, por lo que habría que valorar su aplicabilidad en la detección de otros defectos genéticos.

5.1.2.2 Diagnóstico prenatal de fibrosis quística

Existen trabajos previos que describen el diagnóstico de fibrosis quística a partir de ADN fetal (González-González y cols., 2002; Nasis y cols., 2004) o células fetales circulantes en sangre materna (Saker y cols., 2006). Cada uno de estos trabajos empleó técnicas analíticas diferentes: análisis de restricción (González-González y cols., 2002), PCR específica de alelo (Nasis y cols., 2004), microsatélites y secuenciación (Saker y cols., 2006).

En el trabajo publicado por González-González y cols., se presenta el estudio de una mutación fetal a través del análisis de ADN fetal en plasma materno por análisis de restricción. Sin embargo, una de las grandes limitaciones que tiene este abordaje es la necesidad de la creación de una diana de restricción por parte de la mutación a

estudio. En el trabajo de Nasis y cols., 2004, el estudio del ADN fetal en plasma materno mediante una PCR específica del alelo portador de la mutación presenta resultados satisfactorios, aunque obtienen algunos casos de falsos positivos que los autores atribuyen a la presencia de ADN materno en la muestra.

El presente trabajo muestra el estudio prenatal de tres fetos, con riesgo de padecer fibrosis quística, mediante el análisis de ADN fetal en plasma materno (apartado 4.3; Bustamante-Aragones y cols., 2008a). La técnica analítica empleada fue la técnica de minisequenciación (o SNaPshot) la cual no había sido previamente utilizada en el DPNI. Esta técnica presenta ciertas características que la convierten en una metodología apta para la aplicación clínica. Algunas de estas características son el sencillo manejo, la rapidez, la fácil interpretación de los resultados y el bajo coste, las cuales quedan reflejadas en diversas publicaciones que apoyan la eficacia de la técnica en la detección de diferentes mutaciones (Farez-Vidal y cols., 2004; Filippini y cols., 2007). Los resultados obtenidos en el estudio de los tres casos presentados en este trabajo indican que esta técnica parece ser una técnica sensible y eficaz en la detección de bajas concentraciones de ADN. Se ha validado el método para tres mutaciones diferentes del gen CFTR ya que, en los tres casos estudiados, la mutación paterna asociada a la enfermedad era diferente. Al margen de estos resultados tan satisfactorios, se necesita el estudio de un mayor número de casos para poder determinar la eficacia de la técnica de minisequenciación en el análisis de ADN fetal en plasma materno. Sin embargo, estos resultados preliminares llevan a considerar esta técnica para posteriores estudios e incluso para una futura aplicación clínica.

En la enfermedad de fibrosis quística hay una mutación con una alta frecuencia, la mutación $\Delta F508$, sin embargo, al margen de este cambio, existe una gran heterogeneidad mutacional en población caucásica (Bobadilla y cols., 2002; Farez y cols., 2004). En aquellas gestaciones en los que ambos padres fuesen portadores de la mutación $\Delta F508$, el DPNI no podría realizarse por la imposibilidad de diferenciar la mutación de origen materno y la de origen fetal. La experiencia previa del laboratorio recogida en los últimos ocho años, muestra que el 44% de las parejas que se han sometido a un diagnóstico prenatal por un riesgo alto de fibrosis quística, eran portadores, ambos, de la mutación $\Delta F508$. Basándonos en estos datos de

laboratorio, en DPNI de fibrosis quística podría realizarse en aproximadamente el 56% de los casos restantes remitidos a un diagnóstico prenatal, es decir, aquellos en los que los padres del feto portan mutaciones diferentes en el gen CFTR.

5.1.2.3 Diagnóstico prenatal de acidemia propiónica

Hasta la fecha, no existen evidencias anteriores del diagnóstico prenatal de acidemia propiónica a partir del estudio de ADN fetal en plasma materno. La mutación fetal estudiada en este caso (c.1218del14ins12) es la mutación asociada a AP más frecuente en población caucásica (Lamhonwah y cols., 1990; Rodríguez-Pombo y cols., 1998). Dados los resultados tan satisfactorios obtenidos en el diagnóstico de fibrosis quística mediante la técnica de minisequenciación, en este estudio se utilizó de nuevo esta técnica. Aunque el defecto estudiado no se trataba de una mutación puntual sino de un cambio más complejo, que implicaba una deleción y una inserción, la técnica de minisequenciación volvió a mostrar una alta eficacia en la detección de ADN fetal en plasma materno ya que, de nuevo, permitió la detección de la mutación fetal.

Además en este trabajo se estudió la mutación fetal mediante otra técnica molecular de reciente incorporación en el laboratorio, la técnica de HRM (*High Resolution Melting*). En este segundo abordaje se volvió a diseñar una batería de diluciones seriadas de ADN mutado en ADN control para conocer los patrones generados por la mutación a bajas concentraciones, simulando las condiciones en la muestra de plasma materno. La técnica de HRM, también resultó eficaz en la detección de la mutación fetal. Además, como en el caso anterior de LCA estudiado por dHPLC, la comparación de los patrones generados por las diferentes diluciones y la muestra de plasma materno, reveló que la cantidad de ADN presente en la muestra de plasma materno estudiado representaba aproximadamente el 5% del ADN total.

La técnica de HRM al incluir diferentes análisis a partir de una única reacción de PCR a Tiempo Real, según la aplicación elegida, se podría emplear para realizar una cuantificación absoluta (mediante las curvas de amplificación) de la cantidad de

ADN fetal en una muestra de plasma o una cuantificación relativa, como la realizada en el presente estudio (mediante las curvas de *melting*). Para la cuantificación absoluta, sería necesaria la creación de una curva patrón. Para la cuantificación relativa, habría que seguir la estrategia de las diluciones seriadas, como se ha comentado anteriormente en el apartado 5.1.2.1.

Aunque tanto la minisequenciación como el HRM son técnicas sencillas, rápidas y sensibles, los resultados obtenidos por las curvas de *melting* no son tan objetivos como los obtenidos por la técnica de minisequenciación. Las curvas de *melting* generan unos resultados bastante similares a los obtenidos por el dHPLC. En ambas, la creación de una batería de diluciones es fundamental para poder determinar la presencia de la mutación fetal en la muestra de plasma materno. Sin embargo, en la técnica de minisequenciación estas diluciones no serían necesarias ya que los resultados obtenidos son más objetivos. Sin embargo, la técnica de minisequenciación requiere del diseño de un cebador específico para cada mutación a estudio, mientras que la técnica de HRM sólo requiere de la amplificación inicial del fragmento en el que se localiza el defecto.

La mutación estudiada en este trabajo es el cambio más común en población española asociado a acidemia propiónica, pero aún así, su incidencia es baja. Como en cualquier otra enfermedad metabólica de origen genético, la variabilidad mutacional de este defecto es muy alta. La experiencia del Centro de Diagnóstico de enfermedades moleculares de la Universidad Autónoma de Madrid en el diagnóstico de esta enfermedad, revela que el 80% de los pacientes son heterocigotos compuestos (comunicación personal C. Pérez-Cerdá). Esta gran heterogeneidad nos lleva de nuevo a pensar en el potencial diagnóstico del estudio del ADN fetal en plasma materno para esta enfermedad así como para cualquier otra enfermedad metabólica genética.

5.1.3 Enfermedades ligadas al sexo

Para el diagnóstico de enfermedades genéticas ligadas al sexo el DPNI ofrece dos posibilidades:

- Estudio directo de la mutación responsable de la enfermedad: aplicable sólo para el estudio de defectos genéticos de herencia paterna.
- Diagnóstico del sexo fetal: aplicable a casos en los que cualquiera de los progenitores es portador de un defecto genético en el cromosoma X.

En este trabajo se presentan ambos abordajes: el estudio de una mutación fetal localizada en el cromosoma X y responsable de retinosis pigmentaria (apartado 5.1.3.1; Bustamante-Aragón y cols., 2006) y el estudio de validación e incorporación a la práctica clínica de la determinación del sexo fetal (apartado 5.2).

5.1.3.1 Diagnóstico prenatal de retinosis pigmentaria ligada al X

Se presenta el estudio en plasma materno de una mutación fetal de herencia paterna asociada a retinosis pigmentaria ligada al X (XLRP). Para ello, se utilizó la técnica de secuenciación automática, la cual había sido descrita para el estudio de ADN fetal en plasma materno en un único trabajo anterior (Poon y cols., 2002). Como método de confirmación se empleó la técnica de análisis de restricción, técnica que ya había sido empleada en varios estudios de DPNI (Saito y cols., 2000; González-González y cols., 2002; Li y cols., 2004).

Aunque se estudió plasma materno del primer y segundo trimestre de gestación, la mutación fetal sólo se detectó, mediante ambos abordajes, en la muestra recogida a las 19 semanas. En la muestra de plasma de 10 semanas ninguno de los dos métodos utilizados, incluido el análisis de restricción, permitió la detección de la mutación de origen paterno portada por el feto. Aunque existen trabajos anteriores que muestran el estudio de mutaciones fetales en plasma materno mediante análisis de restricción (Saito y cols., 2000; González-González y cols., 2002; Li y cols., 2004)

dichos estudios se realizaron en muestras de 30, 13 y 34 semanas de gestación respectivamente. Por ello, en el presente trabajo, la no detección de la mutación fetal asociada a XLRP mediante análisis de restricción en la muestra de plasma de 10 semanas de gestación, podría deberse a la menor cantidad de ADN fetal presente en la muestra debido a la temprana edad gestacional.

En un estudio posterior realizado por nuestro grupo se utilizó de nuevo la técnica de secuenciación, en paralelo con la técnica de dHPLC, para el estudio de una mutación fetal asociada a LCA en una muestra de plasma materno de 12 semanas de gestación (apartado 5.1.2.1; Bustamante-Aragón y cols. 2008e). Aunque en dicho estudio la mutación fue detectada mediante la técnica de dHPLC, la secuenciación automática mostró de nuevo una menor sensibilidad de detección al no evidenciar el defecto genético fetal.

En el único estudio anterior en el que se empleaba la técnica de secuenciación automática para la detección de ADN fetal en plasma materno, los autores describen la secuenciación de ADN fetal en muestras pertenecientes al segundo y tercer trimestre de gestación con una eficacia de detección entorno al 50% (Poon y cols., 2002). Basándonos en la experiencia recogida por los dos trabajos realizados por nuestro grupo y el trabajo de Poon y cols. (2002), se deduce que el estudio de ADN fetal mediante secuenciación automática podría estar limitado a muestras de plasma del segundo trimestre de gestación. Aunque esta técnica es rutinariamente empleada en los laboratorios diagnósticos debido a su eficacia y fiabilidad, en el caso del DPNI la baja cantidad de ADN fetal circulante en el primer trimestre de gestación limita su eficacia a muestras de plasma del segundo trimestre.

5.1.4. Valoración de las distintas técnicas empleadas para el estudio de mutaciones fetales de origen paterno

En el diagnóstico prenatal en plasma materno, al igual que en los estudios moleculares convencionales, las diferentes enfermedades a estudio pueden requerir diferentes abordajes. Además, dicho abordaje puede llevarse a cabo mediante el empleo de diferentes técnicas.

En el caso del diagnóstico de corea de Huntington, originado por expansiones dinámicas, el estudio directo de las repeticiones CAG mediante QF-PCR ha mostrado mejores resultados que el estudio indirecto mediante el microsatélite I1CAHD-2. Sin embargo, el estudio indirecto es una aproximación necesaria para el estudio de casos con grandes expansiones así como para casos en los que ambos progenitores comparten el mismo alelo sano. Por ello, en posteriores estudios de esta enfermedad, además del estudio directo, se considerará la implementación del método indirecto mediante el empleo de otros marcadores microsatélites.

En función de los resultados presentados en este trabajo, en cuanto a la eficacia en la detección de mutaciones fetales (no dinámicas), la técnica de minisequenciación parece ser la aproximación más eficaz. En todos los casos en los que se ha empleado esta técnica, se ha conseguido un diagnóstico correcto y de manera precoz, en el primer trimestre de gestación. Por el contrario, la secuenciación automática, en los dos casos estudiados, parece estar limitada a muestras de plasma materno del segundo trimestre de gestación, probablemente por la existencia de un mayor porcentaje de ADN fetal en este trimestre.

En referencia a la técnica de dHPLC y de HRM, ambas son aproximaciones muy parecidas que han mostrado ser eficaces en la detección de mutaciones fetales en el primer trimestre de gestación. Una ventaja que presentan estas dos técnicas frente a la de minisequenciación es que no requieren un primer específico para cada mutación a estudiar, únicamente la amplificación del fragmento que contiene el defecto genético. Sin embargo, los resultados que proporcionan no son tan evidentes como los obtenidos mediante la minisequenciación, requiriendo la creación de una batería de diluciones para su correcta interpretación. Una gran

diferencia existente entre la técnica de HRM y el dHPLC es que la primera, al tratarse de una PCR a Tiempo Real, proporciona un doble análisis en el mismo experimento: curvas de amplificación y curvas de melting. Además esta técnica es más rápida al no requerir una reacción de amplificación previa como ocurre en el dHPLC, lo que implica una menor manipulación de la muestra y por lo tanto un menor probabilidad de contaminación y de pérdida de producto. Así, para futuros estudios, se considerará, preferentemente, la utilización de la técnica de HRM y la técnica de minisequenciación.

5.2. Incorporación a la práctica clínica de la determinación del sexo fetal

La investigación traslacional es un término que ha surgido recientemente para referirse a la incorporación de metodologías empleadas en investigación a la práctica clínica. Es un término con un componente clínico importante ya que se refiere a toda línea de investigación con una meta común: su aplicación al paciente. Como unidad de diagnóstico prenatal nuestros estudios en el campo del DPNI siempre han estado enfocados en la futura aplicación clínica (González-González y cols., 2005).

Uno de los mayores logros para un investigador es el traslado de su metodología a la práctica clínica, es decir, el cubrir una necesidad de un paciente y al cual se refiere el término de investigación traslacional. En este punto, el presente trabajo muestra la incorporación a la rutina clínica de uno de los diagnósticos derivados del estudio del ADN fetal presente en plasma materno: la determinación del sexo fetal. Esta metodología ya ha sido incorporada en otros centros europeos como herramienta diagnóstica (Hyett y cols., 2005; Finning y cols., 2008a).

En aquellas gestaciones en las que el feto presenta un riesgo elevado de una enfermedad ligada al sexo está muy recomendada la realización de un diagnóstico prenatal. Hasta hace poco, este diagnóstico prenatal requería de una biopsia corial o una amniocentesis, pruebas que conllevan un riesgo de pérdida fetal.

La determinación del sexo fetal en sangre materna está destinada a aquellas gestantes que portan un feto con un alto riesgo para una enfermedad ligada al sexo. Algunas de estas enfermedades son la hemofilia, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, raquitismo hipofosfatémico, retinosquiasis, síndrome adrenogenital congénito, enfermedad de Norrie y retinosis pigmentaria ligada al cromosoma X. Al tratarse de enfermedades ligadas al cromosoma X, son los fetos varones los que presentan riesgo para la enfermedad (a excepción del raquitismo hipofosfatémico). En estas enfermedades, la determinación del sexo fetal en el primer trimestre de gestación evitaría la necesidad de un diagnóstico prenatal convencional en el caso de fetos femeninos. Por el contrario, si se tratase de un feto varón, sería necesario un diagnóstico prenatal convencional para determinar el carácter sano o afecto del feto. El diagnóstico del sexo fetal en sangre materna reduce en aproximadamente el 50% de las gestaciones indicadas por riesgo de una enfermedad ligada al sexo o por hiperplasia adrenal congénita la necesidad de una prueba prenatal invasiva (Hyett y cols., 2005; Avent y Chitty, 2006). Una revisión de nuestros datos, como centro de referencia de diagnóstico prenatal de determinadas enfermedades moleculares, muestra que el 11% de la biopsias coriales realizadas tienen como indicación una enfermedad genética ligada al sexo (datos de laboratorio). Suponiendo que la probabilidad de un embarazo de portar un feto femenino es del 50%, el 5,5 % de todas las biopsias coriales realizadas en nuestro hospital podrían evitarse tras la incorporación de este nuevo método prenatal.

La determinación del sexo fetal en plasma materno se realiza a partir del estudio de secuencias específicas del cromosoma Y. La presencia de dichas secuencias en el plasma materno únicamente puede tener un origen fetal, lo que indicaría la presencia de un feto varón en la gestación. En nuestro laboratorio, desde que se comenzó la línea de investigación en ADN fetal en sangre materna, siempre se ha utilizado la detección del gen SRY como medio de comprobación de la presencia de ADN fetal en la muestra. Finalmente, dado que este método podría beneficiar a gestantes en las que existiese un riesgo de una enfermedad ligada al sexo, el método fue validado en una amplia muestra de la población general de gestantes en el primer trimestre de gestación (Bustamante-Aragón y cols., 2008c). Los resultados tan satisfactorios derivados de esta validación permitieron el traslado de la metodología a la práctica

clínica, siendo el laboratorio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz uno de los primeros centros en España en ofrecer este diagnóstico.

Desde que la técnica fue instaurada en el hospital como prueba diagnóstica, han sido numerosas las gestantes que han acudido a la consulta por indicación médica, siendo mujeres portadoras de hemofilia grave el grupo mayoritario. Actualmente el estudio es realizado mediante la recogida de dos muestras de sangre materna dentro del primer trimestre de gestación. En los casos en los que el resultado del estudio de ADN fetal en plasma materno indica un feto varón, la gestante puede decidir la realización de una biopsia para determinar si el feto ha heredado el cromosoma X portador del defecto genético.

5.3. Futuras direcciones

En un futuro próximo podrían incorporarse en la práctica clínica otros diagnósticos prenatales basados en el estudio del ADN fetal en plasma materno. Sin embargo, cualquier técnica que vaya a ser trasladada al diagnóstico requiere un estudio previo de validación mediante el análisis de un gran número de muestras. Dado que la recogida de muestras para el diagnóstico del Rh y sexo fetal es relativamente sencilla, estos diagnósticos ya han podido ser introducidos en la clínica. Sin embargo otros estudios, como el diagnóstico de diferentes enfermedades monogénicas, requieren más tiempo para la recogida de un amplio número de muestras dada la menor incidencia poblacional.

La determinación del Rh fetal en gestantes Rh negativas es un diagnóstico que ya está puesto a punto en el laboratorio. Únicamente queda pendiente el estudio de validación en un amplio número de muestras para establecer su eficacia, sensibilidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. La recogida de estas muestras es más lenta ya que la incidencia de las gestantes Rh negativas no supera el 10 % de las gestaciones anuales.

Otros estudios que se llevarán a cabo en nuestro laboratorio, continuando con el presente trabajo, serán la recogida y el estudio de mayor número de casos de

diferentes enfermedades monogénicas. Basado en la experiencia reflejada en las publicaciones presentadas en este manuscrito, para futuros estudios de mutaciones fetales (no dinámicas) en plasma materno se utilizarán las técnicas de minisequenciación y de HRM. En el caso de la enfermedad de Huntington, al tratarse de una enfermedad originada por mutaciones dinámicas, el abordaje a seguir será el estudio directo de las repeticiones CAG mediante QF-PCR además de implementar el estudio indirecto mediante marcadores microsatélites. El estudio de mayor número de muestras ayudará a establecer en la práctica clínica, en un futuro no muy lejano, el diagnóstico de alguna de las enfermedades monogénicas presentadas en este trabajo.

Al estar basado el diagnóstico de enfermedades monogénicas en un criterio de exclusión, la ausencia del defecto genético en el plasma materno sería reflejo de la ausencia de dicho defecto en el feto. Sin embargo, también podría barajarse la posibilidad de que se tratara de un falso negativo debido a la escasez de ADN fetal en la muestra. Por ello, es fundamental el desarrollo de un método de enriquecimiento de ADN fetal o de un test independiente que demuestre la existencia de ADN fetal. Actualmente existen diversos grupos trabajando en estas dos aproximaciones. Como método de separación, algunos autores han centrado sus investigaciones en las diferencias de tamaño existentes entre el ADN materno y fetal presente en plasma materno (Dhallan y cols., 2004; Li y cols., 2005; Clausen y cols., 2007; Legler y cols., 2007). Sin embargo, estos métodos todavía no están muy logrados. Nuestra experiencia en la aplicación de este método de enriquecimiento no ha sido satisfactoria (datos de laboratorio no mostrados) y por ello no ha sido empleado en los estudios realizados por nuestro grupo.

Dada la presente dificultad para el aislamiento del ADN fetal, el abordaje más sencillo para la confirmación de la presencia de dicho ADN en aquellos casos en los que el defecto genético estudiado no está presente en la muestra de plasma materno, sería el desarrollo de un test independiente del defecto a estudiar. Una de las aproximaciones más sencillas se basa en el estudio de secuencias del cromosoma Y, sin embargo, está limitada a gestaciones de fetos varón. Por ello, se está trabajando en desarrollar otras aproximaciones que sean independientes del sexo fetal. Algunos grupos se han centrado en la búsqueda de marcadores epigenéticos existentes entre

el ADN materno y fetal (Poon y cols., 2002; Chim y cols., 2005). Uno de nuestros próximos objetivos será la elaboración de un panel de SNPs que pueda ser empleado de forma paralela al estudio de defecto genético. En la actualidad, aunque algunos autores han descrito sus primeras experiencias con este tipo de aproximación (Chow y cols., 2007), todavía no existe un método ampliamente validado y aceptado. Por ello, a día de hoy, los estudios de exclusión necesitan ser validados en un amplio número de muestras para asegurar que la no detección del defecto genético en el plasma materno se debe a la ausencia de dicho defecto en el genoma fetal y no a la escasez de ADN fetal en la muestra o a la baja sensibilidad de la técnica analítica empleada.

La aparición de técnicas analíticas cada vez más sensibles permitirá implementar el estudio del ADN fetal presente en plasma materno. Esto abrirá nuevas posibilidades diagnósticas dentro de este campo haciendo que estos diagnósticos estén más presentes en las unidades de diagnóstico prenatal. Sin embargo, para que esta realidad no se alargue en el tiempo, es fundamental la colaboración entre obstetras y genetistas de diferentes centros con el fin de recoger el mayor número de casos posibles y así poder realizar una valoración fiable del método.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONS

1. En el análisis de ADN fetal en plasma materno, la sensibilidad del estudio es dependiente de la edad gestacional de la muestra y de la técnica utilizada.

In the analysis of fetal DNA in maternal plasma, the sensitivity of the study depends on the gestational age of the sample and the analytical technique chosen.

2. La detección de ADN fetal en plasma materno es posible a partir de la quinta semana de gestación.

The detection of fetal DNA in maternal plasma is possible from the fifth week of gestation.

3. El porcentaje de ADN fetal en plasma materno estimado en este trabajo coincide y apoya los valores previamente descritos por otros autores.

The percentage of fetal DNA in maternal plasma estimated in this study confirms and supports the values previously described by other authors.

4. El estudio de enfermedades monogénicas en plasma materno es individual y dirigido, necesitando diferentes aproximaciones y el empleo de distintas técnicas. Por ello, la incorporación de diferentes metodologías es fundamental para ampliar las posibilidades diagnósticas del DPNI.

The study of monogenic disorders in maternal plasma is individualized and directed, requiring the use of different approaches and different techniques. Hence, the incorporation of different methodologies for the study of fetal DNA in maternal plasma is crucial to extend the diagnostic possibilities to be offered by the NIPD.

5. Las técnicas de dHPLC, HRM y minisequenciación permiten el estudio de mutaciones fetales de herencia paterna en plasma materno en el primer trimestre de gestación.

The dHPLC, HRM and mini-sequencing techniques allow the study of paternally inherited fetal mutations in maternal plasma in the first trimester of gestation.

6. El estudio de una mutación fetal en plasma materno mediante las técnicas de dHPLC y HRM requiere el diseño de una batería de diluciones seriadas con cantidades decrecientes de ADN mutado.

The study of a fetal mutation in maternal plasma by the dHPLC and HRM techniques require the design of a battery of serial dilutions with decreasing amounts of mutated DNA in the sample.

7. La técnica de secuenciación automática no ha resultado eficaz para el estudio de ADN fetal en plasma materno en el primer trimestre de gestación pero sí en el segundo trimestre.

Automated sequencing has not been an accurate technique for the study of fetal DNA in maternal plasma in the first trimester of gestation but it has been for the second trimester.

8. Para el estudio prenatal de la enfermedad de Huntington en plasma materno, el análisis directo del número de repeticiones CAG mediante QF-PCR ha demostrado ser más eficaz que el estudio indirecto mediante el microsatélite I1CAHD-2, excepto para el caso de alelos expandidos con alto número de repeticiones.

For the prenatal study of Huntington disease in maternal plasma, the direct analysis of the CAG repeats by QF-PCR has shown to be more accurate than the indirect study by the I1CAHD-2 marker, except for the case of expanded alleles with large number of repeats.

9. La determinación del sexo fetal, basado en el criterio de presencia/ausencia del gen SRY en plasma materno en el primer trimestre de gestación y estudiado mediante PCR a Tiempo Real, es un método fiable a partir de la séptima semana de gestación.

The fetal sex determination, based on a presence/absence criterion of the SRY gene in maternal plasma in the first trimester of gestation and studied by Real-Time PCR, is a reliable method from the seventh week of gestation

- 10.** Se ha trasladado desde la investigación a la práctica clínica el diagnóstico prenatal no invasivo del sexo fetal en el primer trimestre de gestación. Actualmente es un diagnóstico disponible para el estudio de fetos con riesgo de alguna enfermedad ligada al sexo.

The non-invasive prenatal diagnosis of the fetal gender in the first trimester of gestation has been translated from the research bench to the clinical practice. At present, it is a diagnosis disposable for fetuses at-risk of an X-linked disorder.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. REFERENCES

A

Aguirre-Lamban J, Riveiro-Alvarez R, Maia-Lopes S, Cantalapiedra D, Vallespin E, Avila-Fernandez A, Villaverde-Montero C, Trujillo-Tiebas MJ, Ramos C, Ayuso C. Molecular analysis of the ABCA4 gene for reliable detection of allelic variations in Spanish patients: identification of 21 novel variants. *Br J Ophthalmol* 2008 (Pendiente de publicación)

Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, Soothill PW. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn* 2007; 27: 415-418

Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000; 96:271-276

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

Angert RM, LeShane ES, Lo YM, Chan LY, Delli-Bovi LC, Bianchi DW. Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: analysis of first- and third-trimester samples. *Clin Chem* 2003 ; 49:195-8

Avent ND, Chitty LS. Non-invasive diagnosis of fetal sex; Utilising free fetal DNA and ultrasound. *Prenat Diagn* 2006; 26:598-603.

Ayala W, Moore L, Hess E. The purple color reaction given by diphenylamine reagent I. with normal and rheumatic sera. *J Clin Invest* 1951; 30:1732-1740

Ayuso C, Garcia-Sandoval B, Najera C, Valverde D, Carballo M, Antinolo G. Retinitis Pigmentosa in Spain. The spanish multicentric and multidisciplinary group of research into Retinitis Pigmentosa. *Clin Genet* 1995; 48: 120-122

B

Babochkina T, Mergenthaler S, Dinges TM, Holzgreve W, Hahn S. Direct detection of fetal cells in maternal blood: a reappraisal using a combination of two different Y chromosome-specific FISH probes using a single X chromosome-specific probe. *Arch Gynecol Obstet* 2005; 273:166-169

Benachi A, Steffann GE, Ernault P, Olivi M, Dumez CJM. Fetal DNA in maternal serum: does it persist after pregnancy? *Hum Genet* 2003; 113:76-79

Bianchi DN, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JH, Latt SA. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:3279-3283

Bianchi DW, Stewart JE, Garber MF, Lucotte G, Flint AF. Possible effect of gestational age on fetal nucleated erythrocytes in maternal blood. *Prenat Diagn* 1991; 11:523-528

Bianchi DW, Zickwolf GK, Yih MC, Flint AF, Geifman OH, Erikson MS, Williams JM. Erythroid-specific antibodies enhance the detection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood. *Prenat Diagn* 1993; 13:293-300

Bianchi DW, Yih MC, Zickwolf GK, Flint AF. Transferrin receptor (CD71) expression on circulating mononuclear cells during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 202-206

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; 61:822-829

Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Elias S, Holzgreve W, Evans MI, Dukes KA, Sullivan LM, Klinger KW, Bischoff FZ, Hahn S, Johnson KL, Lewis D, Wapner RJ, de la Cruz F. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study. *Prenat Diagn.* 2002; 22: 609-15

Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL, Nguyen DD, Scott J, Schober W, Murrel S, Elias S. Detection of low-grade mosaicism in fetal cells isolated from maternal blood. *Prenat Diagn* 1995; 15:1182-1184

Bobadilla JL, Macek M, Fine J.P, Farrell PM. Cystic Fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations-correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002; 19:575-606

- Borgatti M, Bianchi N, Mancini I, Feriotto G, Gambari R. New trends in non-invasive prenatal diagnosis: applications of dielectrophoresis-based Lab-on-a-chip platforms to the identification and manipulation of rare cells. *Int J Mol Med* 2008 ;21 :3-12
- Brambati B, Simoni G. Diagnosis of fetal trisomy 21 in first trimester. *Lancet* 1983; 1:586
- Brock DJ, Scrimgeour JB. Early prenatal diagnosis of anencephaly. *Lancet* 1972; 2: 1252:1253
- Büsch J, Pflüger E, Miltenyi ST, Holtz J, Radbruch A. Enrichment of fetal cells from maternal blood by high gradient magnetic cell sorting (double MACS) for PCR-based genetic analysis. *Prenat Diagn* 1994; 14:1129-1140
- Bustamante-Aragones A, Garcia-Hoyos M, Rodriguez de Alba M, González-González C, Lorda-Sanchez I, Diego-Alvarez D, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C, Ramos C. Detection of a paternally inherited fetal mutation in maternal plasma by the use of automated sequencing. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1075: 108-117
- Bustamante-Aragones A, Gallego-Merlo J, Trujillo-Tiebas MJ, Rodriguez de Alba MJ, Gonzalez-Gonzalez C, Glover G, Diego-Alvarez D, Ayuso C, Ramos C. Strategy for the prenatal detection/exclusion of paternal Cystic Fibrosis mutations in maternal plasma. *J Cyst Fibr* 2008a (en prensa; doi:10.1016/j.jcf.2008.05.006)
- Bustamante-Aragones A, Perez-Cerda C, Perez B, Rodriguez de Alba M, Ugarte M, Ramos C. Prenatal diagnosis in maternal plasma of a fetal mutation causing Propionic Acidemia. *Mol Genet Metab* 2008b (en prensa; doi:10.1016/j.ymgme.2008.05.006)
- Bustamante-Aragones A, Rodriguez de Alba M, Gonzalez-Gonzalez C, Trujillo-Tiebas MJ, Diego-Alvarez D, Vallespin E, Plaza J, Ayuso C, Ramos C. Foetal sex determination in maternal blood from the seventh week of gestation and its role in diagnosing haemophilia in the foetuses of female carriers. *Haemophilia* 2008c; 14: 593-598
- Bustamante-Aragones A, Trujillo-Tiebas MJ, Gallego-Merlo J, Rodriguez de Alba M, Gonzalez-Gonzalez C, Ayuso C, Ramos C. Prenatal diagnosis of Huntington disease in maternal plasma: direct and indirect study. *European Journal of Neurology* 2008d; (Pendiente de aceptación)
- Bustamante-Aragones A, Vallespin E, Rodriguez de Alba M, Trujillo-Tiebas MJ, Gonzalez-Gonzalez C, Diego-Alvarez D, Riveiro-Alvarez R, Lorda-Sanchez I, Ayuso C, Ramos C. Early non-invasive prenatal detection of a fetal CRB1 mutation causing Leber Congenital Amaurosis. *Mol Vis* 2008e; (en prensa)

C

Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, Lo KW, Huang DW, Lo YM. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004; 50:88-92

Chan KC, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, Lau TK, Chim SS, Chung GT, Nicolaides KH, Lo YM. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: a universal fetal DNA marker that improves the reliability of non-invasive prenatal diagnosis. *Clin Chem* 2006; 52 :2211-2218

Chim SS, Tong YK, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LY, Oudejans CB, Ding C, Lo YM. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:14753-14758

Chim SS, Jin S, Lee TY, Lun FM, Lee WS, Chan LY, Jin Y, Yang N, Tong YK, Leung TY, Lau TK, Ding C, Chiu RW, Lo YM. 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.

Chinnapapagari SK, Holzgreve W, Lapaire O, Zimmermann B, Hahn S. Treatment of maternal blood samples with formaldehyde does not alter the proportion of circulatory fetal nucleic acids (DNA and mRNA) in maternal plasma. *Clin Chem* 2005; 51:652-655

Chiu RW, Lau TK, Cheung PT, Gong ZQ, Leung TN, Lo YM. Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. *Clin Chem* 2002a; 48:778-80

Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YM. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* 2002b; 360: 998-1000

Chiu RW, Chim SS, Wong IH, Wong CS, Lee WS, To KF, Tong JH, Yuen RK, Shum AS, Chan JK, Chan LY, Yuen JW, Tong YK, Weier JF, Ferlatte C, Leung TN, Lau TK, Lo KW, Lo YM. Hypermethylation of RASSF1A in human and rhesus placentas. *Am J Pathol* 2007; 170: 941-950

Chow KC, Chiu RW, Tsui NB, Ding C, Lau TK, Leung TN, Lo YM. Mass spectrometric detection of an SNP panel as an internal positive control for fetal DNA analysis in maternal plasma. *Clin Chem* 2007; 53: 141-142

Choolani M, Ho SS, Razvi K, Ponnusamy S, Baig S, Fisk NM, Biswas A; Rapid Molecular Testing in Prenatal Diagnosis Group. FastFISH: technique for ultrarapid fluorescence in situ hybridization on uncultured amniocytes yielding results within 2 h of amniocentesis. *Mol Hum Reprod* 2007; 13:355-9

Chung GT, Chiu RW, Chan KC, Lau TK, Leung TN, Lo YM. Lack of dramatic enrichment of fetal DNA in maternal plasma by formaldehyde treatment. *Clin Chem* 2005; 51:655-658

Clausen FB, Krog GR, Rieneck K, Dziegiel MH. Improvement in fetal DNA extraction from maternal plasma. Evaluation of the NucliSens Magnetic Extraction system and the QIAamp DSP Virus Kit in comparison with the QIAamp DNA Blood Mini Kit. *Prenat Diagn* 2007; 27:6-10

Clayton EM, Feldhaus MT, Whitacre FE. Fetal erythrocytes in the maternal circulation of pregnant women. *Obstet Gynecol* 1964; 23:915-919

Costa JM, Gautier E, Benachi A. Genetic analysis of the fetus using maternal blood. *Gynecol Obstet Fertil* 2004; 32:646:650

D

De Graaf IM, van Bezouw SMCA, Jakobs ME, Leschot NJ, Zondervan HA, Bilardo CM, Hoovers JMN. First-trimester non-invasive prenatal diagnosis of triploidy. *Prenat Diagn* 1999; 19:175-177

Desviat LR, Pérez B, Pérez-Cerda C, Rodríguez-Pombo P, Clavero S, Ugarte M. Propionic acidemia: mutation update and functional and structural effects of the variant alleles. *Mol Genet Metab* 2004; 83: 28–37

Dhallan R, Au WC, Mattagajasingh S, Emche S, Bayliss P, Damewood M, Cronin M, Chou V, Mohr M. Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. *JAMA* 2004; 291:1114-1119

Dhallan R, Guo X, Emche S, Damewood M, Bayliss P, Cronin M, Barry J, Betz J, Franz K, Gold K, Vallecillo B, Varney J. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet* 2007; 10; 369:474-81

Ding C, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LC, Chan AY, Charoenkwan P, Ng IS, Law HY, Ma ES, Xu X, Wanapirak C, Sanguansermsri T, Liao C, Ai MA, Chui DH, Cantor CR, Lo YM. MS

analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 10762-7

E

Elias S, Price J, Docter M, Wachtel S, Tharapel A, Simpson JL, Klinger KW. First trimester prenatal diagnosis of trisomy 21 in fetal cells from maternal blood. *Lancet* 1992; 340:1033

F

Falcidia E, Parano E, Grillo A, Pavone P, Takabayashi H, Trifiletti RR, Scollo P, Dallapiccola B, Grammatico P, Novelli A, Paladini D, Monni G, Gulisano A, Scassellati G. Fetal cells in maternal blood: a six-fold increase in women who have undergone amniocentesis and carry a fetus with Down syndrome: a multicenter study. *Neuropediatrics*. 2004; 35:321-4

Farez-Vidal ME, Gomez-Llorente C, Blanco S, Morales P, Casals T, Gomez-Capilla JA. Multimutational analysis of eleven Cystic Fibrosis mutations in the Mediterranean areas. *Clin Chem* 2004; 11: 2155-2157

Farina A, LeShane ES, Romero R, Gomez R, Chaiworapongsa T, Rizzo N, Bianchi DW. 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

Filippini S, Blanco A, Fernández-Marmiesse A, Alvarez-Iglesias V, Ruíz-Ponte C, Carracedo A, Vega A. Multiplex SNaPshot for detection of BRCA1/2 common mutations in Spanish and Spanish related breast/ovarian cancer families. *BMC Med Genet*. 2007 ;8:40.

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: 1079-1085

Finning K, Chitty L. Non-invasive fetal sex determination: Impact on clinical practice. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008a;13: 69-75

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* 2008b; 336:816-8.

G

Galbiati S, Smid M, Gambini D, Ferrari A, Restagno G, Viora E, Campogrande M, Bastonero S, Pagliano M, Calza S, Ferrari M, Cremonesi L. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum Genet* 2005; 117: 243-248

Gänshirt-Ahlert D, Burschik M, Garritsen HSP, Helmer L, Miny P, Horst J, Schneider HPG, Holzgreve W. Magnetic cell sorting and the transferring receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 1350-1355

Gautier E, Benachi A, Giovangrandi Y, Ernault P, Olivi M, Gaillon T, Costa JM. Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: a two-year experience. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192 :666-9

Go AT, Visser A, Mulders MA, Blankenstein MA, Van Vugt JM, Oudejans CB. Detection of placental transcription factor mRNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2004 ;50:1413-4

Gonzalez-Gonzalez MC, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J, Gallardo E, Ayuso C, Ramos C. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002; 22: 946-8.

Gonzalez-Gonzalez MC, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Garcia-Hoyos M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C. Huntington disease-unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn* 2003a;23(3):232-4.

González-González MC, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, Ramos C. Early Huntington disease prenatal diagnosis by maternal semiquantitative fluorescent-PCR. *Neurology* 2003b; 8; 60:1214-5.

González-González C, Garcia-Hoyos M, Trujillo-Tiebas MJ, Lorda-Sanchez I, de Alba MR, Infantes F, Gallego J, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C. Application of fetal DNA detection in maternal plasma: a prenatal diagnosis unit experience. *J Histochem Cytochem* 2005; 53:307-14.

Grosset L, Barrelet V, Odartchenko N. Antenatal fetal sex determination in maternal blood during early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1974; 120:60-63

Guibert J, Benachi A, Grebille AG, Ernault P, Zorn JR, Costa JM. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by Real Time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003; 18:1733-1736

H

Hahn S, Zhong XY, Bürk MR, Troeger C, Kang A, Holzgreve W. Both maternal and fetal cell-free DNA in plasma fluctuate. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 945:141-144

Hahn S, Huppertz B, Holzgreve W. Fetal cells and cell free fetal nucleic acids in maternal blood: new tools to study abnormal placentation? *Placenta* 2005; 26:515-26

Hahn S, Chitty LS. Noninvasive prenatal diagnosis: current practice and future perspectives. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008; 20 :146-151

Hahn S, Zhong XY, Holzgreve W. Recent progress in non-invasive prenatal diagnosis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008; 13 :57-62

Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res* 2000; 260: 248-256

Hasselmann DO, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clin Chem* 2001; 47: 1488-1489

Herzenberg LA, Bianchi DW, Schröder 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: 1453-1455

Hoesli I, Danek M, Lin D, Li Y, Hahn S, Holzgreve W. Circulating erythroblasts in maternal blood are not elevated before onset of preterm labor. *Obstet Gynecol* 2002; 100:992-996

Hromadnikova I, Karamanov S, Houbová B, Hridelova D, Kofer J, Mrstinova M. Non-invasive fetal sex determination on fetal erythroblasts from the maternal circulation using fluorescence in situ hybridisation. *Fetal Diagn Ther* 2002a; 17 :193-9.

Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D, Voslarova S, Calda P, Nekolarova K, Kofer J, Stejskal D, Doucha J, Cinek O, Vavriec J. Quantitative analysis of DNA levels in maternal plasma in normal and Down syndrome pregnancies. *BMC Pregnancy Childbirth* 2002b; 28; 2:4

Hui L, Vaughan JI, Nelson M. Effect of labor on postpartum clearance of cell-free fetal DNA from the maternal circulation. *Prenat Diagn* 2008; 28: 304-308

Hyett JA, Gardener G, Stojilkovic-Mikic T, Finning KM, Martin PG, Rodeck CH, Chitty LS. Reduction in diagnostic and therapeutic interventions by non-invasive determination of fetal sex in early pregnancy. *Prenat Diagn* 2005; 25:1111-1116.

I

Invernizzi P, Biondi ML, Battezzati PM, Perego F, Selmi C, Cecchini F, Podda M, Simoni G. Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy. *Hum Genet* 2002; 110 :587-91

J

Jacobson C, Barter R. Intrauterine diagnosis and management of genetic defects. *Am J Obstet Gynecol* 1967; 99:796

Johnson-Hopson CN, Arlett CM. Evidence against the long-term persistence of fetal DNA in maternal plasma after pregnancy. *Hum Genet* 2002; 111:575

Johnson KL, Stroh H, Khosrotehrani K, Bianchi DW. Spot counting to locate fetal cells in maternal blood and tissue: a comparison of manual and automated microscopy. *Microsc Res Tech* 2007 ;70 :585-588.

Jorgez CJ, Dang DD, Wapner R, Farina A, Simpson JL, Bischoff FZ. Elevated levels of total (maternal and fetal) beta-globin DNA in maternal blood from first trimester pregnancies with trisomy 21. *Hum Reprod* 2007; 22: 2267-2272

K

Kagan KO, Wright D, Baker A, Sahota D, Nicolaides KH. Screening for trisomy 21 by maternal age, fetal nuchal translucency thickness, free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008 May (en prensa)

Kaplan J, Bonneau D, Frezal J, Munnich A, Dufier JL. Clinical and genetic heterogeneity in retinitis pigmentosa. *Hum Genet.* 1990; 85 :635-42

Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Haemaglobin in den erythrocyten eines Elutastriches. *Klinische Wochenschrift* 1957; 35:637-638

Kolialexi A, Tsangaris GT, Antsaklis A, Tzortzatos F, Amentas C, Koratzis A, Mavrou A. Apoptosis in maternal peripheral blood during pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 2001; 16:32-37

Krabchi K, Gadj M, Forest JC, Drouin R. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood in different cases of aneuploidies. *Clin Genet.* 2006; 69:145-54

L

Lamhonwah A, Troxel C, Schuster S, Gravel RA. Two distinct mutations at the same site in the PCCB gene in propionic acidemia. *Genomics* 1990; 8: 249–254

Lapaire O, Volgmann T, Huang D, Hahn S, Holzgreve W, Zhong XY. Maternal smoking: effect on circulating cell-free fetal and total DNA levels in maternal plasma from the second trimester. *Obstet Gynecol.* 2007; 110:1358-63

Lau TW, Leung TN, Chan LY, Lau TK, Chan KC, Tam WH, Lo YM. Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia. *Clin Chem* 2002; 45:2141-2146

Lazaros L, Hatzi E, Bouba I, Paraskevidis E, Georgiou I. Non-invasive prenatal detection of paternal origin hb leporine in a male fetus at the 7th week of gestation. *Fetal Diagn Ther* 2006; 21:506-509

- Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion* 2001; 41:276-282
- Legler TJ, Liu Z, Mavrou A, Finning K, Hromadnikova I, Galbiati S, Meaney C, Hultén MA, Crea F, Olsson ML, Maddocks DG, Huang D, Fisher SA, Sprenger-Haussels M, Soussan AA, van der Schoot CE. Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2007; 2727:824-829
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free fetal DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37:646-650
- 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
- Leung TN, Zhang J, Lau TK, Chan LY, Lo YM. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clin Chem* 2001; 47:137-139
- Li Y, Holzgreve W, Page-Christiaens GC, Gille JJ, Hahn S. Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma-case report. *Prenat Diagn* 2004; 24:896-898
- Li Y, Di Naro E, Vitucci A, Zimmermann B, Holzgreve W, Hahn S. Detection of paternally inherited fetal mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA* 2005; 293:843-849
- Li Y, Page-Christiaens GC, Gille JJ, Holzgreve W, Hahn S. Non-invasive prenatal detection of achondroplasia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS assay. *Prenat Diagn* 2007; 27:11-7
- Lo YM, Ciribetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 16; 350: 485-487
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62:768-775
- Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999a; 64:218-224

- Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, Haines CJ, Redman CW. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 1999b; 45:184-188
- Lo YM, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AM, Hjelm NM, Elmes RS, Bianchi DW. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem* 1999c; 45: 1747-1751
- Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Heung MM, Gerovassili A, Jin Y, Nicolaides KH, Cantor CR, Ding C. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med.* 2007a ;13 :218-23
- Lo YM, Lun FM, Chan KC, Tsui NB, Chong KC, Lau TK, Leung TY, Zee BC, Cantor CR, Chiu RW. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007b; 104: 13116-21.
- Loke Y, King A. Immunology of human placental implantation: clinical implications of our current understanding. *Mol Med Today* 1997; 3:153-159

M

- Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Acad Sci Paris* 1948; 142:241-243
- Masuzaki H, Miura K, Yoshiura KI, Yoshimura S, Niikawa N, Ishimaru T. Detection of cell free placental DNA in maternal plasma: direct evidence from three cases of confined placental mosaicism. *J Med Genet* 2004; 41:289-292
- Masuzaki H, Miura K, Yamasaki K, Miura S, Yoshiura K, Yoshimura S, Nakayama D, Mapendano CK, Niikawa N, Ishimaru T. Clinical applications of plasma circulating mRNA analysis in cases of gestational trophoblastic disease. *Clin Chem.* 2005; 51:1261-3
- Mavrou A, Kouvidi E, Antsaklis 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.
- Minon JM, Gerard C, Senterre JM, Schaaps JP, Foidart JM. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion* 2008; 48:373-81

Moutou C, Gardes N, Viville S. New tools for preimplantation genetic diagnosis of Huntington's disease and their clinical applications. *Eur J Hum Genet* 2004; 12 : 1007-1014

Musarella MA, Anson-Cartwright L, Leal SM, Gilbert LD, Worton RG, Fishman GA, Ott J. Multipoint linkage analysis and heterogeneity testing in 20 X-linked retinitis pigmentosa families. *Genomics* 1990; 8: 286-296.

N

Nance MA, Myers RH. Juvenile onset Huntington's disease—clinical and research perspectives. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2001; 7 : 153-157

Nasis O, Thompson S, Hong T, Sherwood M, Radcliffe S, Jackson L, Otevrel T. Improvement in sensitivity of allele-specific PCR facilitates reliable non-invasive prenatal detection of cystic fibrosis. *Clin Chem* 2004 ;50 :694-701

Ng EK, Tsui NB, Lam NY, Chiu RW, Yu SC, Wong SC, Lo ES, Rainer TH, Johnson PJ, Lo YM. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem.* 2002 ;48 :1212-7

Ng EK, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW, Panesar NS, Lit LC, Chan KW, Lo YM. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 15; 100:4748-53

Nicolaides KH. First-trimester screening for chromosomal abnormalities. *Semin Perinatol* 2005; 29: 190-194

Norbury G, Norbury CJ. Non-invasive prenatal diagnosis of single gene disorders: How close are we?. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008; 13: 76-83

O

Old RW, Crea F, Puszyk W, Hulten MA. Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome. *Reprod Biomed Online* 2007; 15:227-235

Oudejans CB, Go AT, Visser A, Mulders MA, Westerman BA, Blankenstein MA, van Vugt JM. Detection of chromosome 21-encoded mRNA of placental origin in maternal plasma. *Clin Chem*. 2003 ; 49:1445-9.

P

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

Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2000 ; 46:1832-4.

Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Circulating fetal RNA in maternal plasma. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 945: 207-10.

Poon LL, Leung TN, Lau TK, Chow KCK, Lo YDM. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2002; 48:35-41

R

Ramos C, Recasens JD, Benitez J, Santolaya J, Sanchez Cascos A. Early cytogenetic diagnosis by chorion biopsy. *Rev Clin Esp* 1984; 15-31; 174:21-23

Rjinders RJ, Christiaens GC, Soussan AA, van der Schoot CE. Cell-free fetal DNA is not present in plasma of nonpregnant mothers. *Clin Chem* 2004; 50:697-681

Rodriguez de Alba M, Palomino P, Jurado A, Sanz R, Ibañez MA, Fernandez-Moya JM, Ayuso C, Diaz Recasens J, Lahoz C, Ramos C. Prenatal diagnosis on fetal cells obtained from maternal peripheral blood: report of 66 cases. *Prenat Diagn* 1999; 19:934-940

Rodriguez de Alba M, Gonzalez-Gonzalez MC, Palomino P, Ramos C. Prenatal diagnosis on fetal cells from maternal peripheral blood in cases of confined placental mosaicism. *Prenat Diagn* 2000; 20:264-265

Rodriguez de Alba M, Palomino P, Gonzalez-Gonzalez C, Lorda-Sanchez I, Ibañez MA, Sanz R, Fernandez-Moya JM, Ayuso C, Diaz-Recasens J, Ramos C. Prenatal diagnosis on fetal cells from maternal blood: practical comparative evaluation of the first and second trimesters. *Prenat Diagn* 2001; 21:165-170

Rodriguez-Pombo P, Hoenicka J, Muro S, Perez B, Perez-Cerda C, Richard E, Desviat LR, Ugarte M. Human propionyl-CoA carboxylase beta subunit gene: exon-intron definition and mutation spectrum in Spanish and Latin American propionic academia patients. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 63: 360–369.

Rubinsztein D. Draft best practice guidelines for molecular analysis of Huntington disease. EMQN 2002

S

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

Saker A, Benachi A, Bonnefont JP, Munnich A, Dumez Y, Lacour B, Paterlini-Brechot P. Genetic characterisation of circulating fetal cells allows non-invasive prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Prenat Diagn.* 2006; 26:906-16

Schmörl G. Pathologisch-anatomische untersuchungen ueber Publerekampsie. *Vogel* 1893.

Sekizawa A, Kimura T, Sasaki M, Nakamura S, Kobayashi R, Sato T. Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy using a single fetal nucleated erythrocyte in maternal blood. *Neurology* 1996; 46:1350-1353

- Sekizawa A, Samura O, Zhen DK, Falco V, Farina A, Bianchi DW. Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Prenat Diagn* 2000; 20:886-889
- Sekizawa A, Sugito Y, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Hoshi S, Saito H, Okai T. Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum. *Clin Chem* 2001; 47:2164-2165
- Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Sugito Y, Yukimoto U, Otsuka J, Okai T. Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem* 2002; 48:353-354
- Shaffer LG, Bui TH. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2007;145: 87-98
- Slunga-Tallberg A, El-Rifai W, Keinänen M, Ylinen K, Kurki T, Klinger K, Ylikorkala O, Larramendy ML, Knuutila S. Maternal origin of nucleated erythrocytes in peripheral venous blood of pregnant women. *Hum Genet* 1995; 96:53-57
- Smid M, Galbiati S, Vassallo A, Gambini D, Ferrari A, Viora E, Pagliano M, Restagno G, Ferrari M, Cremonesi L. No evidence of fetal DNA persistence in maternal plasma after pregnancy. *Hum Genet* 2003; 112:617-618
- Smid M, Galbiati S, Lojaco A, Valsecchi L, Platto C, Cavoretto P, Calza S, Ferrari A, Ferrari M, Cremonesi L. Correlation of fetal DNA levels in maternal plasma with Doppler status in pathological pregnancies. *Prenat Diagn* 2006; 26: 785-790
- Sorenson GD, Porter DM, Barth RJ, Memoli VA, Rhodes CH, Karagas M. Detection of mutated KRAS2 sequences in plasma from patients with pancreatic carcinoma in comparison with the CA19-9 assay. *J Int Soc Oncodev Biol Med* 1997; 18, 66
- Steele MW, Breg WR. Chromosome analysis of human amniotic fluid cells. *Lancet* 1966; 1:383
- Strickland S, Richards WG. Invasion of the trophoblasts. *Cell* 1992; 30; 71:355-357
- Swinkels DW, de Kok JB, Hendriks JCM, Wiegerinck E, Zusterzeel PLM, Steegers EAP. Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, and low platelet count (HELLP) syndrome as a complication of preeclampsia in pregnant women increases the amount of cell-free fetal and maternal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2002; 48:650-653

T

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; 15:74-77

Tjoa ML, Delli-Bovi 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 :85-89

Tong YK, Lo YM. Plasma epigenetic markers for cancer detection and prenatal diagnosis. *Front Biosci* 2006a; 11:2647-2656

Tong YK, Ding C, Chiu RWK, Gerovassili A, Chim SS, Leung TY, Leung TN, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: theoretical and empirical considerations. *Clin Chem* 2006b; 52:2194-2202

Troeger C, Zhong XY, Burgemeister R, Minderer S, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S. Approximately half of the erythroblasts in maternal blood are of fetal origin. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 1162-1165

Tsui NB, Chim SS, Chiu RW, Lau TK, Ng EK, Leung TN, Tong YK, Chan KC, Lo YM. Systematic micro-array based identification of placental mRNA in maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expression profiling. *J Med Genet.* 2004;41: 461-467.

Tsui NB, Chiu RW, Ding C, El-Sheikhah A, Leung TN, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM. Detection of trisomy 21 by quantitative mass spectrometric analysis of single-nucleotide polymorphisms. *Clin Chem.* 2005 ;51:2358-62.

Tsui DW, Chan KC, Chim SS, Chan LW, Leung TY, Lau TK, Lo YM, Chiu RW. Quantitative aberrations of hypermethylated RASSF1A gene sequences in maternal plasma in pre-eclampsia. *Prenat Diagn* 2007 ; 27: 1212-1218.

V

Vallespin E, Cantalapiedra D, Riveiro-Alvarez R, Wilke R, Aguirre-Lamban J, Avila-Fernandez A, Lopez-Martinez MA, Gimenez A, Trujillo-Tiebas MJ, Ramos C, Ayuso C. Mutation screening of 299 Spanish families with retinal dystrophies by Leber congenital amaurosis genotyping microarray. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 ; 48 :5653-61.

Valverde D, Riveiro-Alvarez R, Aguirre-Lamban J, Baiget M, Carballo M, Antinolo G, Millan JM, Garcia Sandoval B, Ayuso C. Spectrum of the *ABCA4* gene mutations implicated in severe retinopathies in Spanish patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 985-990.

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.

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* 1994; 86:774-779

W

Wataganara T, LeShane ES, Farina A, Messerlian GM, Lee T, Canick JA, Bianchi DW. Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. *Hum Genet* 2003; 112: 204-208

Y

Yin A, Ng EH, Zhang X, He Y, Wu J, Leung KY. Correlation of maternal plasma total cell-free DNA and fetal DNA levels with short term outcome of first-trimester vaginal bleeding. *Hum Reprod* 2007; 22: 1736-1743

Z

Zheng YL, Carter NP, Price CM, Colman SM, Milton PJ, Hackett GA, Greaves MF, Ferguson-Smith MA. Prenatal diagnosis from maternal blood: simultaneous immunophenotyping and FISH of fetal nucleated erythrocytes isolated by negative magnetic cell sorting. *J Med Genet* 1993; 30:1051-1056

Zheng YL, Craigo SD, Price CM, Bianchi DW. Demonstration of spontaneously dividing male cells in maternal blood by negative magnetic cell sorting and FISH. *Prenat Diagn* 1995; 15:573-578

Zhong XY, Burk MR, Troeger C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Fluctuation of maternal and fetal free extracellular circulatory DNA in maternal plasma. *Obstet Gynecol* 2000a; 96:991-996

Zhong XY, Burk MR, Troeger C, Jackson LR, Holzgreve W, Hahn S. Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat Diagn* 2000b; 20: 795-798

Zhong XY, Holzgreve W, Li JC, Aydinli K, Hahn S. High levels of fetal erythroblasts and fetal extracellular DNA in the peripheral blood of a pregnant woman with idiopathic polyhydramnios: Case Report. *Prenat Diagn* 2000c; 20:838-841

Zhong XY, Laivuori H, Livingston JC, Ylikorkala O, Sibai BM, Holzgreve W, Hahn S. Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:414-419

Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Direct quantification of fetal cells in maternal blood by real-time PCR. *Prenat Diagn* 2006; 26: 850-4

Zhong XY, Hahn S, Steinborn A, Holzgreve W. Quantitative analysis of intact fetal cells in maternal plasma by real-time PCR. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007; 133:20-4