

## DIAGNOSTICO PRENATAL NO INVASIVO. ACIDOS NUCLEICOS DE ORIGEN FETAL EN SANGRE MATERNA

CARLA SESARINI<sup>1</sup>, PABLO ARGIBAY<sup>1, 3</sup>, LUCAS OTAÑO<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Diagnóstico Prenatal, Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental (ICBME);

<sup>2</sup>Unidad de Medicina Fetal, Servicio de Obstetricia, <sup>3</sup>Instituto Universitario, Hospital Italiano de Buenos Aires

**Resumen** Las técnicas actuales de diagnóstico prenatal de enfermedades génicas y cromosómicas incluyen procedimientos invasivos que conllevan un pequeño, pero significativo, riesgo. Por muchos años se ha estudiado la posibilidad de utilizar células fetales en circulación materna; sin embargo, ha fracasado su implementación clínica debido a su escasez y persistencia luego del parto. Desde hace más de una década se detectó ADN fetal libre en sangre de embarazadas. Este sería de origen placentario e indetectable después del parto, y fuente de material fetal para el desarrollo de técnicas diagnósticas utilizando sangre materna. No obstante, la mayoría del ADN libre en circulación materna es de origen materno con una contribución fetal del 3% al 6% aumentando a lo largo de la gestación. Dado que los métodos actuales no permiten separar el ADN libre fetal del materno, las aplicaciones se focalizan en el análisis de genes no presentes en la madre, tales como secuencias del cromosoma Y, o gen RHD en madres Rh negativas, o mutaciones paternas o *de novo*. Asimismo, la detección de ARN fetal libre en sangre de embarazadas abrió la posibilidad de obtener información acerca de patrones de expresión génica de tejidos embrionarios y, utilizando genes que se expresan sólo en la unidad feto-placentaria, se podría establecer un control de presencia de material fetal, independiente del material genético de la madre. El presente trabajo describe las evidencias acerca del pasaje de ácidos nucleicos fetales a circulación materna, su aplicación actual en el diagnóstico prenatal y posibles usos futuros.

**Palabras clave:** ADN fetal libre, ARN fetal libre, diagnóstico prenatal

**Abstract** *Non invasive prenatal diagnosis. Fetal nucleic acid analysis in maternal blood.* Current prenatal diagnosis of monogenic and chromosomal diseases, includes invasive procedures which carry a small but significant risk. For many years, analysis of fetal cells in maternal circulation has been studied, however it has failed its clinical use due to the scarcity of these cells and their persistence after delivery. For more than a decade, the presence of cell-free fetal DNA in maternal blood has been identified. These fetal DNA fragments would derive from the placenta and are not detected after delivery, making them a source of fetal material for carrying out diagnosis techniques using maternal blood. However, the vast majority of cell free DNA in maternal circulation is of maternal origin, with the fetal component contributing from 3% to 6% and rising towards term. Available methodologies do not allow separation of fetal from maternal cell free DNA, so current applications have been focused on the analysis of genes not present in the mother, such as Y chromosome sequences, or RHD gene in RhD-negative women, or paternal or *de novo* mutations. Also, the detection of cell-free fetal RNA in maternal blood offers the possibility of obtaining information regarding genetic expression profiles of embryonic tissues, and using genes expressed only at the feto-placental unit, controls for the presence of fetal material could be established, regardless of maternal genetic tissue. The present article describes the evidences regarding the passage of fetal nucleic acids to maternal circulation, its current prenatal diagnosis application and possible future perspectives.

**Key words:** cell-free fetal DNA, cell-free fetal RNA, prenatal diagnosis

Es conocido desde hace mucho tiempo que durante el embarazo existen células fetales y placentarias en la circulación materna. En un primer momento, se especuló con la posibilidad del uso de estas células para lograr una técnica de diagnóstico prenatal no invasivo. No obstante,

su baja concentración en sangre materna, las dificultades metodológicas para identificarlas y analizarlas, y el hecho de que pueden persistir en la madre durante décadas, han constituido hasta ahora un obstáculo insalvable para su uso clínico<sup>1</sup>.

Más recientemente, a partir de la detección de ADN libre (extracelular) de origen tumoral en plasma y suero de pacientes con cáncer<sup>2</sup>, y basándose en similitudes biológicas entre un embarazo en crecimiento y una neoplasia, Lo y col., identificaron una secuencia del cromosoma Y en plasma de embarazadas de fetos masculinos, iniciando

Recibido: 11-III-2010

Aceptado: 28-VII-2010

**Dirección Postal:** Dr. Lucas Otaño, Servicio de Obstetricia, Hospital Italiano de Buenos Aires, Potosí 4135, 1199 Buenos Aires, Argentina  
Fax: (54-11) 4958-4421      lucas.otano@hospitalitaliano.org.ar

el camino del diagnóstico prenatal a partir de los ácidos nucleicos libres de origen fetal en sangre materna<sup>3</sup>.

La técnica utilizada para la detección del ADN fetal libre (ADNfl) en plasma es mucho más simple, rápida y confiable que la detección de células fetales en sangre materna, no requiere de los complejos procesos de enriquecimiento previo, y no existen dudas que el ADN fetal corresponde al embarazo en curso dado que presenta una vida media muy corta y desaparece de la circulación materna dentro de las primeras horas luego del parto<sup>4</sup>.

Desde los trabajos pioneros a la actualidad, el análisis no invasivo de genes a través de muestras de sangre materna se ha convertido en una realidad en la práctica clínica en determinadas situaciones como el diagnóstico del factor Rh y el sexo fetal. El desafío actual reside en desarrollar la metodología adecuada para la detección de anomalías de genes y de cromosomas fetales<sup>5</sup>.

En el presente trabajo de revisión se describen las evidencias acerca del pasaje de ácidos nucleicos fetales a la circulación materna, su aplicación actual en el diagnóstico prenatal y sus posibles usos futuros.

## Biología del ADN fetal circulante

El ADNfl ha sido identificado tanto en suero como en plasma materno, aunque en general se utiliza el plasma dado que la concentración de ADN materno libre es menor. Del total de ADN libre que circula en el plasma de una embarazada, 3 a 6% es de origen fetal y su concentración aumenta con la edad gestacional, con un incremento marcado durante las últimas 8 semanas de embarazo<sup>6</sup>, no detectándose luego de las dos horas post-parto (vida media de 16.3 minutos<sup>4</sup>). La apoptosis y necrosis, eventos de "turnover" celular normales en placenta, han sido propuestos como responsables de la depuración continua del ADNfl<sup>7</sup>.

Aunque no totalmente dilucidado, se estima que la fuente de ADNfl en sangre materna proviene del sinciotrofoblasto, habiéndose detectado a partir del día 18 de gestación, antes que la circulación embrio-fetal esté establecida<sup>8</sup>.

El conocimiento de la concentración de ADNfl en embarazos sanos ha permitido estudiar sus variaciones en embarazos patológicos. La magnitud de la transfusión feto-materna de células y ADN sería un potencial indicador del estado de la placenta, habiéndose observado que un nivel elevado de células y ADNfl en circulación materna se asocia con una disrupción de la barrera placentaria y complicaciones del embarazo<sup>9</sup>. Dado que la principal fuente de ADNfl son las células trofoblásticas, es lógico que los niveles de ADNfl en plasma materno se encuentren elevados en patologías placentarias con procesos de apoptosis aumentados y áreas de infarto<sup>10</sup>.

Se han detectado aumentos cuantitativos significativos de ADNfl en plasma materno en asociación con varias

patologías del embarazo, tales como parto prematuro, aneuploidías, preeclampsia, hemorragia feto-materna y trastornos adherenciales de la placenta (acretismo)<sup>9</sup>. En los casos de preeclampsia (6 al 10% de los embarazos), se ha cuantificado un incremento en la concentración media de ADNfl de cinco veces mayor respecto a embarazos normales<sup>11</sup>.

## Aplicaciones diagnósticas actuales

El análisis de ADNfl en sangre materna permite identificar secuencias de ADN fetal que no se encuentran en la madre ya que los métodos actuales no permiten separar ADN libre fetal del materno<sup>12</sup>. Por ejemplo, se puede determinar el sexo fetal, el Rh fetal en madres Rh negativas, mutaciones génicas autosómicas dominantes de origen paterno o *de novo*, y mutaciones de patologías recesivas en las que la mutación paterna es diferente de la materna, como por ejemplo en algunas parejas en riesgo de fibrosis quística<sup>13</sup>.

### *Determinación del genotipo fetal Rh*

La presencia o ausencia del polipéptido D representa la base genética del polimorfismo del grupo sanguíneo RhD positivo y negativo. No obstante, el sistema Rh es altamente polimórfico y está codificado por dos genes: RHD y RHCE, que comparten un 93.8% de homología y están organizados en 10 exones. El fenotipo RhD negativo tiene una frecuencia en la población caucásica del 15%<sup>14</sup> y en la población argentina su prevalencia sería del 9.11%<sup>15</sup>.

El conocimiento del Rh fetal durante el embarazo puede tener implicancias tanto en la prevención primaria como en el manejo clínico de la isoimmunización Rh. La isoimmunización Rh o enfermedad hemolítica fetoneonatal (EHFN) está causada por anticuerpos maternos dirigidos contra el antígeno D que se forman en respuesta al pasaje de eritrocitos fetales RhD positivos a la circulación materna. Las consecuencias clínicas de esta sensibilización pueden conducir a anemia hemolítica fetal, hidropesía fetal, muerte intrauterina o necesidad de transfusiones intrauterinas y/o de parto prematuro. Si el padre es heterocigota para el gen RhD, en los embarazos posteriores es importante investigar la presencia del antígeno D en el feto<sup>16</sup>. El conocimiento del Rh fetal en estos casos es esencial para el asesoramiento y control del caso clínico, incluyendo la necesidad de realizar procedimientos invasivos diagnósticos y terapéuticos.

Hasta ahora, el Rh fetal sólo se podía conocer a través de un estudio invasivo sobre el embarazo, ya sea extrayendo una muestra de vellosidades coriónicas, o de líquido amniótico o sangre fetal, procedimientos con riesgo de pérdida de embarazo y que a su vez aumentan el grado de sensibilización como resultado de hemorragias materno-fetales<sup>17</sup>.

Con relación a la prevención primaria de la isoinmunización Rh, la estrategia que se aplica consiste en administrar inmunoglobulina anti-D a toda embarazada RhD negativa, con pareja Rh positiva, en la semana 28 de gestación, o luego de procedimientos invasivos sobre el embarazo, o en caso de hemorragias, y luego del parto si el recién nacido es Rh positivo. Se estima que entre el 35 y 40% de estas embarazadas Rh negativas estarán gestando un feto Rh negativo, siendo la administración de inmunoglobulina durante el embarazo innecesaria. El conocimiento del Rh fetal a través del plasma materno limitaría la profilaxis sólo a aquellas mujeres embarazadas con fetos RhD positivo<sup>13</sup>, evitando así una carga económica en los servicios de salud así como una exposición innecesaria de las embarazadas a los riesgos asociados con productos humanos hemoderivados<sup>17</sup> (Tabla 1). Todavía no existen estudios que hayan evaluado adecuadamente las relaciones costo-beneficio y costo-efectividad de la aplicación sistemática de la genotificación Rh fetal en las embarazadas Rh negativas no sensibilizadas.

Debido a la alta complejidad del sistema Rh, deben ser examinadas más de una región del gen RHD<sup>17</sup>. Desde el punto de vista clínico, el principal riesgo son los resultados falsos negativos porque impedirían medidas de prevención en situaciones que las requieren. Las causas de resultados falsos negativos pueden deberse al uso de una metodología poco sensible. Se debe utilizar una amplificación de secuencias altamente sensibles y para ello se emplea una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, (*Real Time-PCR*), o una muy baja concentración de ADNfl en plasma materno. Por otra parte, los resultados falsos positivos no tienen implicancias clínicas relevantes dado que sólo se tomarían medidas de prevención en fetos Rh negativos innecesariamente, como se ha hecho hasta ahora<sup>25</sup>. Los falsos positivos pueden deberse a variantes en el gen RHD o posiblemente a la persistencia de células trofoblásticas de un embarazo múltiple con un gemelo que se perdió precozmente: *vanishing twin*<sup>17</sup>.

La determinación del Rh fetal en plasma materno ya es de aplicación clínica en muchos lugares en el mundo. Por ejemplo, desde el año 2001, se ha utilizado en varios centros de Europa. Incluso, en Inglaterra esto ha reemplazado casi por completo a los procedimientos invasivos para conocer el Rh fetal en el control de la isoinmunización Rh. La alta exactitud metodológica alcanzada ha sido demostrada por muchos grupos<sup>12</sup>, y en la actualidad también se ha desarrollado en nuestro país<sup>19</sup>.

#### *Determinación del sexo fetal*

El diagnóstico del sexo fetal en forma no invasiva se puede realizar confiablemente por ecografía (sexo fenotípico) a partir de las 13-14 semanas<sup>26</sup>. Antes de ese período se debe apelar al diagnóstico de sexo genético, lo cual ha

requerido hasta ahora la extracción de células del embarazo por biopsia de vellosidades coriónicas a partir de las 10-11 semanas. El análisis en ADNfl en sangre materna permite evaluar el sexo genético a partir de la 6ta semana y evita el riesgo de un procedimiento invasivo. Esta alternativa mejora el asesoramiento y control de embarazos en riesgo como en enfermedades ligadas al cromosoma X, la hiperplasia suprarrenal congénita o en malformaciones que afectan selectivamente a un sexo<sup>27</sup>.

Las mujeres portadoras de mutaciones génicas ligadas al X (tales como hemofilia, adrenoleucodistrofia, distrofia muscular de Duchenne y enfermedad de Hunter), tienen un 50% de riesgo de tener hijos varones afectados por estas enfermedades<sup>7</sup>. La detección prenatal no invasiva del sexo fetal evitaría los procedimientos invasivos prenatales para evaluar la enfermedad en los fetos femeninos<sup>28</sup>.

Otro ejemplo de su aplicación clínica se da en los embarazos en riesgo de hiperplasia suprarrenal congénita (HSC). Dado que es una enfermedad autosómica recesiva, las parejas que han tenido un hijo afectado de HSC son portadores heterocigotos de la mutación y tienen un riesgo de recurrencia de 25% en cada embarazo. Si el feto afectado es femenino, sufre además un proceso de virilización de los genitales externos que puede ser prevenido con la administración a la madre de corticoides. En la práctica se comienza a administrar dexametasona a la madre desde las 7 semanas de embarazo hasta tener los resultados de los estudios genéticos realizados en vellosidades coriónicas (alrededor de las 12 semanas) y se suspende la administración de corticoides en los casos que el feto sea masculino o si el feto femenino no está afectado<sup>29</sup>. El conocimiento del sexo embrionario antes de comenzar el tratamiento permite evitar la exposición a corticoides y a procedimientos invasivos (biopsia de vellosidades coriónicas) en la mitad de los embarazos que estarían gestando un feto masculino<sup>18</sup> (Tabla 1).

#### *Diagnóstico de enfermedades génicas*

Las enfermedades producidas por mutación de genes (génicas) pueden ser diagnosticadas a través del ADNfl en plasma materno cuando se esté evaluando una mutación que no esté presente en la madre.

En las parejas en riesgo de tener en su descendencia un hijo con una enfermedad génica con patrón de herencia autosómico recesivo, ambos son portadores heterocigotas para el gen mutado. Si la mutación de ese gen es diferente entre los miembros de la pareja (heterocigosis compuesta), el alelo paterno mutado podría ser investigado en el plasma de la embarazada. La ausencia de la mutación paterna en ADNfl descarta que el feto esté afectado de la enfermedad en estudio. Si la mutación paterna está presente, será necesario extraer células del embarazo por una técnica invasiva tradicional para diagnosticar la condición de afectado o portador.

TABLA 1.— ADN fetal en sangre materna. Estudios diagnósticos actuales

Indicación	Ejemplos
Determinación de sexo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enfermedades ligadas al X: hemofilia, distrofia muscular de Duchenne<sup>7</sup>, etc.</li> <li>- Prevención de virilización en fetos en riesgo para hiperplasia suprarrenal congénita, con tratamiento sólo a fetos femeninos<sup>18</sup>.</li> <li>- Malformaciones con preferencia hacia un sexo: valvas uretrales posteriores en varones, persistencia de cloaca en mujeres.</li> </ul>
Determinación de Rh fetal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uso racional y eficiente de la inmunoglobulina anti-D en madres Rh negativas no sensibilizadas<sup>19</sup>.</li> <li>- Asesoramiento y manejo prenatal de madres Rh negativas sensibilizadas.</li> </ul>
Diagnóstico de enfermedades génicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Búsqueda de alelos paternos en enfermedades autosómicas recesivas: fibrosis quística<sup>20</sup>, talasemia<sup>21</sup>, hiperplasia suprarrenal congénita<sup>18</sup>, etc.</li> <li>- Búsqueda de mutaciones dominantes de origen paterno, o mutaciones <i>de novo</i>, sospecha ecográfica de acondroplasia<sup>22</sup>, distrofia miotónica<sup>23</sup>, enfermedad de Huntington<sup>24</sup>.</li> </ul>

En los casos en que ambos miembros de la pareja sean portadores de la misma mutación, no son posibles por el momento de un diagnóstico prenatal en plasma de la embarazada, dado que no se podría diferenciar el ADN fetal del materno (Tabla 1).

En las enfermedades génicas con patrón de herencia autosómico dominante pueden ser diagnosticadas prenatalmente cuando la mutación es de origen paterno (padre afectado) o *de novo*, es decir sospecha de feto afectado de una enfermedad dominante con padres no afectados. Un ejemplo de esta última situación es la sospecha ecográfica de un feto con acondroplasia<sup>22</sup>. También aquí, si la afectada es la mujer, la posible mutación fetal no podrá ser identificada por esta técnica (Tabla 1).

## Aplicaciones diagnósticas en desarrollo

### Anomalías cromosómicas

Se ha observado que en embarazos con trisomía 21 la concentración de ADNfl en plasma materno se encuentra aumentada. Sin embargo, esta observación, si bien podría tener un rol como herramienta de cribado, no permite realizar el diagnóstico<sup>9</sup>. Actualmente, el principal

desafío en el área del diagnóstico prenatal no invasivo se encuentra en la evaluación de aneuploidías fetales<sup>30</sup>, para lo cual es esencial poder diferenciar ácidos nucleicos fetales de los maternos en el plasma de la embarazada. La epigenética resultaría útil para superar este obstáculo y se ha convertido en la base de la estrategia para el estudio de aneuploidías a través del análisis de secuencias epigenéticamente modificadas.

La epigenética involucra procesos tales como la metilación del ADN, que alteran el fenotipo pero no están asociados con cambios en la secuencia de ADN. El promotor del gen MASPIN presenta diferencias entre el estado de metilación materno y fetal: no se encuentra metilado en placenta pero sí hipermetilado en sangre materna, pudiéndose discriminar secuencias de ADN fetales de maternas<sup>31</sup>. Dado que el gen MASPIN se localiza en el cromosoma 18, cuantificando la relación respecto de los alelos (proporción 1:1 en caso de ploidía normal y 2:1 en aneuploidías), sería posible determinar si el feto presenta trisomía 18. No obstante, este enfoque es aún técnicamente difícil<sup>32</sup>.

Basado en el análisis de ARN fetal libre, ARNfl, (se explica en detalle más adelante) también se ha estudiado el gen PLAC4, cuya expresión es estrictamente placentaria<sup>30</sup>. Dado que dicho gen se localiza en el cromosoma 21, el análisis cuantitativo de los niveles de expresión del ARNm de PLAC4 podría utilizarse para estudiar por espectrometría de masa y utilizando SNP (*single nucleotide polymorphism*), el nivel de ploidía del cromosoma 21. En casos de ploidía normal, el transcrito del ARNfl de PLAC4 tendrá una proporción igual de cada alelo (1:1), mientras que en los casos de aneuploidías cromosómica (trisomía 21) la proporción será de 2:1<sup>30</sup>. Si bien el test podría ser utilizado en los tres trimestres de gestación y pareciera ser un enfoque prometedor, existe la limitante en cuanto que la técnica sólo podría aplicarse a los casos informativos donde el feto es heterocigota para los *loci* SNP estudiados. No obstante, podría extenderse a una población mayor utilizando SNP en otros genes candidatos.

## ARNm fetal en plasma materno

Luego del descubrimiento de ADNfl en plasma materno, se comenzó a estudiar la posibilidad de detectar ARN fetal circulante en sangre materna.

En el año 2000, se detectó por primera vez la presencia de ARNm fetal libre (ARNfl) en plasma de mujeres embarazadas con fetos masculinos, amplificando una secuencia específica del cromosoma Y (ZFY) en plasma materno<sup>33</sup>. El análisis de ADNfl en plasma brinda información sobre la presencia y concentración del material genético fetal en la circulación materna, mientras que el análisis de ARNfl en plasma, brindaría además importante información acerca de los patrones de expresión génica de los tejidos fetales. Otra ventaja importante del ARNfl

sobre el ADNfl es el hecho que se podrían utilizar genes que se expresan sólo en la unidad feto-placentaria como control de presencia de material fetal tanto femenino como masculino<sup>10</sup>.

El 99% del ARNm libre agregado a una muestra de plasma es degradado por RNAsas, mientras que el ARNm endógeno es remarcablemente estable en plasma o suero<sup>34</sup>. Con base en estos resultados, se ha propuesto que el ARNfl podría estar asociado a lípidos o proteínas, unido al ADN en nucleosomas, cuerpos apoptóticos u otras estructuras vesiculares, por lo que estaría siendo protegido de la degradación por nucleasas<sup>32</sup>. La fuente de estas moléculas de ARNfl provendría, al igual que el ADNfl, del sinciotrofoblasto, hipótesis que se apoya en el hecho de la rápida remoción posparto<sup>27</sup>.

Con el objeto de determinar la vida media del ARNfl en plasma materno, se estudiaron los transcritos fetales de lactógeno placentario humano (hPL) y de la subunidad  $\beta$  de la gonadotropina coriónica humana ( $\beta$ -hCG); se observó que  $\beta$ -hCG se expresa principalmente durante el primer trimestre del embarazo, mientras que hPL se expresa en los tejidos placentarios en el primer y tercer trimestre. A partir de los estudios con muestras posparto, amplificando hPL, se pudo determinar que la vida media ARNfl es de 14 minutos<sup>35</sup>. A diferencia del ADNfl en plasma materno que aumenta a lo largo de la gestación, los transcritos de ARNfl varían su expresión durante cada trimestre del embarazo; cada gen tiene un patrón de expresión que depende de la edad gestacional<sup>36</sup>.

Otro resultado observado al estudiar los niveles de ARNm de origen fetal del gen CRH (factor liberador de corticotrofina) es un incremento de 10 veces en pacientes que desarrollaron preeclampsia respecto a controles. Es decir, que tanto la concentración de ADNfl como la de ARNfl aumentaría en pacientes que desarrollan preeclampsia comparadas con muestras de embarazos normales<sup>37</sup>. Esta observación permite especular que la concentración de ácidos nucleicos fetales en plasma materno podría tener un papel en las estrategias de cribado para preeclampsia.

En conclusión, la factibilidad de analizar ácidos nucleicos (ADN y ARN) fetales sin poner en riesgo el embarazo a través de procedimientos invasivos como los que se han utilizado hasta ahora, ha abierto un nuevo camino en diagnóstico prenatal. Los beneficios del diagnóstico prenatal no invasivo son claros; elimina el riesgo asociado a técnicas invasivas, permite realizar un diagnóstico temprano en el embarazo, reduce la ansiedad en la mujer embarazada, y disminuye los costos<sup>38</sup>. Los próximos desafíos diagnósticos en esta área estarán dados por la evaluación diferenciada de ácidos nucleicos de origen fetal de maternos y la evaluación de anomalías cromosómicas<sup>39</sup>. Además, la observación del aumento del ADNfl en embarazos que desarrollarán trastornos como preeclampsia<sup>12</sup>, restricción de crecimiento intrauterino y prematurez<sup>9</sup>, no

sólo permitirá mejorar los conocimientos sobre estas condiciones, sino que también abre nuevas posibilidades en el área del cribado de estas anomalías.

Además, la posibilidad de contar con diagnóstico genético prenatal en forma no invasiva y eficiente, en un futuro cercano podría producir un cambio de paradigma luego de un amplio debate de los aspectos operativos, sociales y éticos<sup>12,38</sup>.

**Agradecimientos:** El presente trabajo ha sido financiado por la Fundación para el Desarrollo de las Ciencias Básicas (FUCIBA), el Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental (ICBME) y el Servicio de Obstetricia del Hospital Italiano de Buenos Aires.

**Conflictos de interés:** Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

## Bibliografía

1. Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol* 1999; 105: 574-83.
2. Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 1996; 2: 1033-5.
3. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485-7.
4. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 218-24.
5. Hahn S, Chitty LS. Noninvasive prenatal diagnosis: current practice and future perspectives. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008; 20: 146-51.
6. 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.
7. Lo YM, Chiu RW. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 71-7.
8. Norbury G, Norbury CJ. Non-invasive prenatal diagnosis of single gene disorders: How close are we? *Semin Fetal Neonatal Med* 2008; 13: 76-83.
9. Bauer M, Hutterer G, Eder M, et al. A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator for adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn* 2006; 26: 831-6.
10. Alberry MS, Soothill PW. Non-invasive prenatal diagnosis: Implications for antenatal diagnosis and management of high-risk pregnancies. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008; 13: 84-90.
11. Lo YM, Leung TN, Tein MS, et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 1999; 45: 184-8.
12. Chitty LS, Crolla J. Noninvasive prenatal diagnosis using cell-free DNA in maternal plasma. Scientific Advisory Committee (Opinion Paper 15) Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, June 2009.
13. Faas BH, Beuling EA, Christiaens GC, von dem Borne KEG, van der Schoot CE. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet* 1998; 352: 1196.
14. Colin Y, Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP. Genetic basis of the RHD-positive and RHD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood* 1991; 78: 2747-52.

15. Quiroga Micheo E; Vilaseca AB; Bonder MC; Quiroga Vergara ER. Frecuencia de los grupos sanguíneos y análisis de la progresiva disminución del factor Rh negativo en la población Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 1998; 48: 355-60.
16. Cotorruelo C, Biondi C, García Borrás S, Di Monaco R, Martino W, Racca A. Genotipificación del sistema RH en líquido amniótico. *Medicina (Buenos Aires)* 2001; 61: 76-8.
17. Van der Schoot CE, Hahn S, Chitty L. Non-invasive prenatal diagnosis and determination of fetal Rh status. *Semin Fetal Neonat Med* 2008; 13: 63-8.
18. Rijnders RJ, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroede MA, Christiaens GC. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol* 2001; 98: 374-8.
19. Sesarini C, Giménez ML, Redal MA, et al. Diagnóstico genético prenatal no invasivo de factor Rh y sexo fetal a través del análisis de ADN fetal libre en plasma materno. *Arch Argent Pediatr* 2009; 107: 405-9.
20. González-González MC, García-Hoyos M, Trujillo MJ, et al. Prenatal diagnosis of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002; 22: 946-8.
21. Fucharoen G, Tungwivat W, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Prenatal detection of fetal hemoglobin E gene from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2003; 23: 393-6.
22. 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.
23. 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.
24. González-González MC, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, et al. Huntington disease-affected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn* 2003; 23: 232-4.
25. Brojer E, Zupanska B, Guz K, Orzińska A, Kalińska A. Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion* 2005; 45: 1473-80.
26. Odeh M, Granin V, Kais M, Ophir E, Bornstein J. Sonographic fetal sex determination. *Obstet Gynecol Surv* 2009; 64: 50-7.
27. Avent N, Plummer Z, Madgett T, Maddocks D, Soothill P. Post-genomics studies and their application to non-invasive prenatal diagnosis. *Semin Fetal Neonat Med* 2008; 13: 91-8.
28. Chi C, Hyett JA, Finning KM, Lee CA, Kadira RA. Non-invasive first trimester determination of fetal gender: a new approach for prenatal diagnosis of haemophilia. *BJOG* 2006; 113: 239-42.
29. Nimkarn S, New MI. Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 300: 192-6.
30. Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 2007; 13: 218-3.
31. Chim S, Tong Y, Chiu R, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 14753-8.
32. 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: 2194-202.
33. Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2000; 46: 1832-4.
34. Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* 2002; 48: 1647-3.
35. Chiu R, Lui W, Cheung M, et al. Time profile of appearance and disappearance of circulating placenta-derived mRNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2006; 52: 313-6.
36. Maron JL, Johnson KL, Slonim D, et al. Gene expression analysis in pregnant women and their infants identifies unique fetal biomarkers that circulate in maternal blood. *J Clin Invest* 2007; 117: 3007-19.
37. Zhong XY, Gebhardt S, Hillermann R, Carelse Tofa K, Holzgreve W, Hahn S. Parallel assessment of circulatory fetal DNA and corticotropin-releasing hormone mRNA in early and late-onset preeclampsia. *Clin Chem* 2005; 51: 1730-3.
38. Benn PA, Chapman AR. Practical and ethical considerations of noninvasive prenatal diagnosis. *JAMA* 2009; 301: 2154-6.
39. Hahn S, Zhong XY, Holzgreve W. Recent progress in non-invasive prenatal diagnosis. *Semin Fetal Neonat Med* 2008; 13: 57-62.

- - - -

*Forbear to ask what tomorrow may bring. If you spend your whole life waiting for the storm, you'll never enjoy the sunshine.*

Hay que abstenerse de preguntar que traerá el mañana. Si se pasa la vida entera esperando la tormenta, no se llegará a disfrutar del sol.

Morris West (1916-1999)

The clowns of God. New York: William Morrow, 1981, p 44