



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Terapia Pediatrica e Farmacologia dello Sviluppo

Ciclo XXIV

TITOLO TESI

*DIAGNOSI PRENATALE NON INVASIVA DI MALATTIE
MONOGENICHE ATTRAVERSO LA RICERCA E L'ISOLAMENTO DI
CELLULE E DNA FETALE NEL SANGUE MATERNO*

Settore scientifico disciplinari di afferenza

BIO/11 BIOLOGIA MOLECOLARE

Presentata da: Dott.ssa Antonella Contini

Coordinatore Dottorato: Prof. R. Galanello

Relatore: Prof.ssa M.C. Rosatelli

Esame finale anno accademico 2010 - 2011

INDICE

<i>INTRODUZIONE</i>	3
<i>Diagnosi prenatale mediante l'identificazione di cellule fetali nel circolo materno</i>	11
<i>Tipi cellulari</i>	11
Trofoblasti.....	11
Linfociti	12
Eritroblasti	13
<i>Metodi per l'isolamento e l'arricchimento degli eritroblasti fetali</i>	16
Centrifugazione su gradiente di densità	17
Arricchimento e selezione mediante anticorpi	17
Analisi eritroblasti arricchiti dal sangue materno.....	21
Fluorescence in situ Hybridization (FISH).....	22
Polimerase chain reaction (PCR).....	22
<i>Diagnosi prenatale mediante l'utilizzo di DNA fetale libero nel plasma materno</i>	24
Diagnosi di sesso e caratterizzazione del fattore RhD	26
Diagnosi di aneuploidie	29
Diagnosi di malattie monogeniche	31
<i>OBIETTIVO DELLO STUDIO</i>	34
<i>PAZIENTI E METODI</i>	35
<i>Isolamento degli eritroblasti fetali dal sangue materno</i>	35
Isolamento degli NRBC fetali	36
Arricchimento	38
Identificazione degli NRBC fetali	39

<i>Saggi di immunocitochimica:</i>	39
Anticorpo anti catene globiniche epsilon marcato con FITC.....	39
Anticorpo anti catene gamma coniugato alla Ficoeritrina.....	40
Lisi cellulare	41
<i>Analisi del DNA fetale libero nel plasma materno</i>	43
Separazione del plasma	43
Estrazione del DNA fetale.....	44
Determinazione del sesso	45
RISULTATI	53
<i>Identificazione di cellule fetali nel circolo materno</i>	53
<i>DNA fetale libero nel plasma materno</i>	55
CONCLUSIONI	58
BIBLIOGRAFIA	64

INTRODUZIONE

La diagnosi genetica prenatale è l'insieme delle indagini diagnostiche, strumentali e di laboratorio che permette di individuare la presenza di malattie monogeniche e di alterazioni cromosomiche nel feto prima della nascita.

Il perfezionamento delle tecniche di prelievo del materiale fetale, parallelamente allo sviluppo dei metodi di indagine per lo studio del DNA e per l'analisi del cariotipo, ha fornito, nel corso degli ultimi trent'anni, un importante strumento di prevenzione per le coppie a rischio per malattie genetiche.

Secondo le stime dell'International Bioethics Committee (ITB UNESCO 2003), circa il 90% delle coppie a rischio che può accedere alla diagnosi prenatale (DP) decide di intraprendere una gravidanza. Al contrario, quando la DP non è accessibile, circa il 50% delle coppie rinuncia alla procreazione. Parallelamente alla DP sono stati sviluppati dei programmi di screening per il monitoraggio della gravidanza fisiologica che consentono di individuare le pazienti che presentano un rischio aumentato per alcune cromosomopatie fetali. Queste indagini si basano sulla misurazione di alcuni marcatori biochimici presenti nel siero materno (bi-test e tri-test) e di parametri

ultrasonografici fetali (ad es. misura della translucenza nucale e dell' osso nasale). I markers sierologici più utilizzati sono rispettivamente le beta gonadotropine corioniche (free β -HCG) e la Proteina Plasmatica A associata alla gravidanza (PAPP-A) che vengono misurati nel primo trimestre di gravidanza (bi-test). La translucenza nucale (NT) viene eseguita tra l'11^a e la 14^a settimana di gestazione e consiste nella misurazione dello spazio linfatico compreso tra la colonna vertebrale e la cute della regione posteriore del collo fetale. Valori alterati della NT sono spesso associati alla presenza di anomalie di tipo cromosomico o di malformazioni fetali. Il test non è comunque esente da falsi positivi e la sua sensibilità aumenta decisamente se viene associato al dosaggio dei marcatori sierologici.

Per questo motivo solo attraverso l'analisi combinata dei marcatori sierologici, ultrasonografici, dell'età materna e l'utilizzo di specifici algoritmi, è possibile diagnosticare, ad esempio, fino all' 95 % dei feti con Sindrome di Down, con un 5% di falsi positivi. Inoltre, un prerequisito fondamentale, affinché questi test siano attendibili, è che vengano eseguiti da personale e in strutture altamente qualificate, nell'esatta epoca gestazionale in cui la determinazione dei parametri biochimici e sonografici è maggiormente informativa.

Ciononostante, diverse evidenze sperimentali dimostrano che a fronte dei successi ottenuti nel campo dello screening non invasivo delle aneuploidie più frequenti (ad es. trisomie 21 e 18), esiste ancora un cospicuo numero di

anomalie cromosomiche fetali (ad es. traslocazioni de novo, aneuploidie rare, inversioni de novo, ecc) che sfugge ai test di screening non invasivi. In uno studio retrospettivo pubblicato recentemente è stato stimato che il numero di tali cromosomopatie, associate a fenotipi clinici rilevanti, che potrebbero sfuggire alla diagnosi eseguita solo attraverso i test di screening non invasivi sia nelle donne a rischio (età >35 anni) che in quelle non a rischio (età <35 anni) per gravidanze con anomalie cromosomiche fetali sia circa il 50% (Grati et al., 2010).

Nella pratica clinica questo dato si traduce nella necessità di dovere ancora ricorrere all'uso di procedure diagnostiche invasive ogniqualvolta esista l'esigenza di investigare o di confermare la presenza di una anomalia cromosomica nel feto. Infatti, dal momento che gli accertamenti ecografici e/o sierologici forniscono solo una stima del rischio di avere un feto affetto da sindrome di Down o da altre anomalie cromosomiche, per diagnosticare con certezza la presenza di tali patologie è necessario ricorrere all'indagine gold standard ovvero alla cariotipizzazione mediante prelievo di villi coriali o all'amniocentesi.

Le stesse considerazioni possono essere applicate alla diagnosi delle malattie monogeniche per le quali a tutt'oggi, a parte alcune rare eccezioni che verranno discusse nei paragrafi successivi, non vi sono ancora metodi di indagine non invasivi applicati di routine nella pratica clinica.

La villocentesi e l'amniocentesi sono, quindi, le due tecniche invasive di

prelievo che vengono utilizzate con successo da circa trent'anni, sia per la diagnosi delle anomalie cromosomiche, attraverso l'analisi del cariotipo delle cellule fetali, che per la diagnosi delle malattie monogeniche, mediante lo studio del DNA estratto dalle cellule fetali. La villocentesi viene eseguita, intorno all'11^a-13^a settimana, invece l'amniocentesi a partire dalla 15^a settimana di gestazione. Entrambe le tecniche hanno, tuttavia, un rischio basso, ma definito di interruzione della gravidanza.

L'amniocentesi consiste nel prelievo ecoguidato di liquido amniotico (LA), eseguito per via transaddominale mediante ago da spinale. L'analisi del cariotipo fetale viene eseguito sugli amniociti isolati da 15-20 ml di liquido amniotico e posti in coltura per circa due settimane. Il rischio di perdita fetale legato all'invasività di questa procedura diagnostica, attestato intorno allo 0.5-1%, è da sommare alla percentuale di rischio di aborto spontaneo che, alla 16^a settimana di gestazione, è stimato intorno allo 0,7%. Possono, inoltre, subentrare altre complicanze transitorie quali la perdita di liquido amniotico o l'alloimmunizzazione Rh in pazienti Rh negative non sensibilizzate e con partner Rh positivo. In questi casi, una volta eseguito l'esame, è necessario somministrare alla paziente le globuline anti-D (RhoGAM).

La villocentesi (CVS) è stata sviluppata come strumento di diagnosi prenatale per la prima volta nel 1983 (Brambati et al., 1983) e ha rappresentato una grande innovazione poiché può essere eseguita in epoca

gestazionale precoce e, inoltre, perché consente di ottenere maggiori quantità di tessuto fetale per le indagini molecolari. Questo esame viene eseguito intorno all'11^a settimana di gravidanza e consiste nel prelievo ecoguidato, per via transaddominale o transcervicale, di tessuto trofoblastico (villi coriali) proveniente dal *corion frondosum*.

L'anticipazione dell'epoca del prelievo e la precocità della diagnosi, rendono la villocentesi la tecnica di elezione per lo studio delle aneuploidie vive e delle patologie monogeniche nelle donne con rischio elevato.

Il tessuto acquisito è composto da tre tipi di cellule: citotrofoblasti, sinciziotrofoblasti e cellule del mesenchima.

I citotrofoblasti sono cellule in mitosi spontanea che possono essere utilizzate per l'analisi citogenetica diretta (coltura a breve termine); al contrario, le cellule mesenchimali vengono utilizzate per allestire colture a lungo termine.

L'impiego combinato dei preparati diretti e delle colture a lungo termine, consente di aumentare l'informatività diagnostica di questo esame poiché prende in esame due popolazioni cellulari aventi diversa origine embrionale.

Inoltre, questo approccio aiuta a risolvere uno dei principali problemi che si riscontra durante le indagini citogenetiche eseguite su villi coriali, ovvero la presenza di mosaicismi che potrebbero inficiare l'esito della diagnosi prenatale (Goldberg et al., 1997).

Come per l'amniocentesi, il rischio di perdita fetale legato all'invasività di

questa procedura diagnostica è valutata intorno allo 0.5-1% da sommarsi alla percentuale di rischio di aborto spontaneo relativo all'epoca di esecuzione dell'esame. Infine, anche in questo caso, è possibile che sopraggiunga, quale complicazione transitoria, l'alloimmunizzazione Rh in pazienti Rh negative, con partner Rh positivo.

Il prelievo dei villi coriali può presentare problematiche di contaminazione materna, dovuta al prelievo di cellule della decidua materna insieme a quelle del trofoblasto fetale. Per questo motivo, prima che il campione venga processato, è opportuno eseguire una attenta dissezione del tessuto al microscopio ottico al fine di eliminare l'eventuale frazione materna.

La presenza di un rischio di complicanze ha orientato l'utilizzo della DP su precise indicazioni cliniche.

È possibile ottenere una stima statistica del rischio di generare un feto affetto da aberrazioni cromosomiche o patologie con base monogenica considerando alcune situazioni particolari.

Le attuali linee guida per i test genetici suddividono le indicazioni per la diagnosi prenatale in due grandi categorie:

1) presenza di un rischio procreativo prevedibile a priori:

- età materna avanzata;
- genitore portatore di anomalie cromosomiche strutturali;
- genitori portatori di mutazioni geniche;

2) presenza di un rischio fetale reso evidente nel corso della gestazione:

- malformazioni evidenziate all'esame ecografico;
- malattie infettive insorte in gravidanza;
- positività dei test biochimici per anomalie cromosomiche;
- familiarità per patologie genetiche.

Le indicazioni per le indagini citogenetiche per anomalie cromosomiche fetali sono:

- età materna avanzata (= o > 35 aa.);
- genitori con precedente figlio affetto da patologia cromosomica;
- genitore portatore di riarrangiamento strutturale non associato ad effetto fenotipico;
- genitore con aneuploidie dei cromosomi sessuali compatibili con la fertilità;
- anomalie malformative evidenziate ecograficamente;
- probabilità di 1/250 o maggiore che il feto sia affetto da Sindrome di Down (o alcune altre aneuploidie) sulla base dei parametri biochimici (bi-test) valutati su sangue materno o ecografici (translucenza nucale e osso nasale).

Negli ultimi decenni sono state sviluppate importanti linee di ricerca che hanno aperto nuove prospettive nel campo della diagnosi prenatale non invasiva (*NIPD*) in epoca gestazionale precoce, sia per la diagnosi delle aneuploidie che delle malattie monogeniche.

In particolare, è stata dimostrata la presenza di cellule fetali nella

circolazione periferica materna e, inoltre, è stata documentata la presenza di DNA fetale libero (*cff DNA: cell free fetal DNA*), fin dalle prime settimane di gravidanza.

Nonostante in letteratura siano stati descritti diversi casi di *NIPD* eseguiti con successo utilizzando entrambi gli approcci diagnostici, tuttavia le metodologie d'indagine utilizzate stentano ancora ad essere trasferite nella pratica clinica a causa della loro estrema complessità dovuta alla esigua quantità di materiale genetico fetale presente nella circolazione materna. Infatti, come sarà descritto nei paragrafi successivi, sia l'isolamento delle cellule che del DNA fetale libero richiedono spesso l'utilizzo di metodologie di arricchimento e di selezione piuttosto articolate che necessitano di ulteriore implementazione.

I dati che emergono dalla letteratura pubblicata negli ultimi anni ci fanno sperare che l'applicazione delle tecnologie di biologia molecolare di nuova generazione (ad es Digital PCR, Next generation sequencing, ecc) possano dare un nuovo impulso agli studi in questo campo di ricerca ed accorciare i tempi di trasferimento alla pratica clinica della *NIPD*. Nelle pagine che seguono saranno descritti, in paragrafi distinti, i protocolli diagnostici e i risultati più significativi che sono stati ottenuti nel campo della *NIPD* eseguita attraverso lo studio delle cellule fetali e del *cffDNA* isolati dalla circolazione periferica materna.

Diagnosi prenatale mediante l'identificazione di cellule fetali nel circolo materno

L'utilizzo delle cellule fetali presenti nel circolo materno è stato considerato una strategia promettente per poter effettuare la diagnosi prenatale non invasiva (*NIPD: Non Invasive Prenatal Diagnosis*) delle malattie genetiche.

La loro presenza nella circolazione materna è stata documentata per la prima volta nel 1893 (Schmorl et al.,1893), da quel momento le popolazioni cellulari oggetto di studio sono state: trofoblasti, linfociti ed eritroblasti.

Tipi cellulari

Trofoblasti

I trofoblasti oltrepassano facilmente la barriera placentare, si riversano nel sangue materno durante la gravidanza e possono essere distinti sulla base di una morfologia definita.

La presenza di cellule del trofoblasto nella circolazione materna, è stata dimostrata per la prima volta alla fine del XIX secolo, quando furono ritrovate nei polmoni di donne decedute per eclampsia (Schmorl et al.,1893).

Studi successivi hanno poi confermato la presenza di cellule del trofoblasto nella circolazione materna (Douglas et al.,1959). Durante il primo trimestre di gravidanza, le cellule del trofoblasto si sfaldano dalla loro sede anatomica

e raggiungono la circolazione materna grazie al sangue che irrori gli spazi tra i villi.

I trofoblasti presenti nella circolazione materna, vengono rapidamente intrappolati nei polmoni, questo causa una rapida e considerevole diminuzione del loro numero (Sargent et al., 1994). La mancanza di anticorpi specifici rende difficile l'isolamento e l'arricchimento dei trofoblasti fetali. Inoltre un altro problema è rappresentato dal fatto che l'1% delle cellule del trofoblasto presentano un cariotipo a mosaico che potrebbe inficiare l'esito della diagnosi (Henderson et al., 1996). Le problematiche ed i limiti appena descritti non consentono l'utilizzo di questa popolazione cellulare per condurre una *NIPD*.

Linfociti

L'utilizzo di cellule nucleate fetali, come i linfociti, per la *NIPD*, non fu ritenuta una valida possibilità sino al 1969, quando si ebbe la dimostrazione della loro capacità di oltrepassare la barriera placentare e di riversarsi nella circolazione materna. Il maggior limite per l'utilizzo dei linfociti fetali è rappresentato dalla loro persistenza anche numerosi anni dopo il parto, inficiando il risultato della diagnosi prenatale in gravidanze successive (Schorder et al., 1974; Hsieh et al., 1993; Bianchi et al., 1996).

In questo studio venne, infatti, dimostrata la presenza di cellule con cariotipo 46 XY in colture linfocitarie di 21 donne in gravidanza, 19 delle quali

avevano partorito un maschio (Walknowska et al.,1969). Questi risultati vennero successivamente confermati mediante studi molecolari effettuati su specifiche sequenze del cromosoma Y(Grosset et al., 1974) (Parks and Herzbenbeg, 1982).

Il maggior limite per l'utilizzo dei linfociti fetali è rappresentato dalla loro persistenza, anche numerosi anni dopo il parto, inficiando il risultato della diagnosi prenatale in gravidanze successive (Schroder et al.,1974; Hsieh et al., 1993; Bianchi et al., 1996). Questi limiti hanno indotto ad abbandonare lo studio dei linfociti fetali come target ideale per lo sviluppo della *NIDP*.

Eritroblasti

Nell'uomo, per ragioni di ordine sia etico che pratico, non sono stati condotti molti studi sull'eritropoiesi primitiva, la quale è stata invece ampiamente studiata utilizzando come modello sperimentale lo sviluppo embrionale del topo.

Da questi studi sono emersi due tipi di eritropoiesi: l'eritropoiesi primitiva, che avviene nel sacco vitellino e l'eritropoiesi definitiva che ha luogo prevalentemente nel fegato fetale e nel midollo osseo. Le cellule eritroidi primitive sono presenti nelle isole di sangue del sacco vitellino fino alla sesta settimana (Maximow, 1909) e l'eritropoiesi primitiva è il primo processo di sviluppo che produce eritrociti necessari per l'ossigenazione, la sopravvivenza e la crescita del feto. Alcuni studi, tuttavia, hanno indicato che

L'eritropoiesi definitiva nasce dai precursori degli emoangioblasti nello strato mesodermico della parete del sacco vitellino (Choi et al., 1998; Ema et al., 2006; Lugus et al., 2009). Per lungo tempo si è creduto che gli eritroblasti primitivi condividessero numerose caratteristiche con i loro analoghi nei non mammiferi, quali ad esempio l'essere nucleate per tutto l'arco della vita. Il processo di enucleazione degli eritroblasti primitivi è stata un'incognita fino a quando, di recente, sono stati scoperti ed ampiamente studiati nei modelli animali in vivo. Dall'enucleazione degli eritroblasti si generano due popolazioni cellulari: i reticolociti anucleati e i pirenociti ovvero i nuclei espulsi dagli eritroblasti che sono circondati da un sottile margine di citoplasma e vengono rapidamente rimossi dai macrofagi mediante fagocitosi (Yoshida et al., 2005; McGrath et al., 2008). Secondo uno studio recente (Van Handel et al., 2010), la placenta umana sarebbe il sito anatomico dove gli eritroblasti primitivi perderebbero il nucleo; l'enucleazione comporterebbe l'interazione con i macrofagi nei villi placentari (Van Handel et al., 2010) (Fig. 1).

Gli eritroblasti primitivi umani, similmente alle cellule staminali embrionali (hESCs), hanno un elevato rapporto nucleo-citoplasma (Bongso et al., 1994) e subiscono consistenti cambiamenti morfologici nel corso della loro maturazione. Si verifica, infatti, un aumento della concentrazione di emoglobina nel loro citoplasma, (De la Chapelle et al., 1969), le loro dimensioni si riducono (Henery and Kaufman, 1992), i loro nuclei si

condensano progressivamente (Sasaki and Kendall, 1985) e perdono i contatti con i filamenti intermedi delle componenti citoscheletriche, divenendo così liberi di muoversi nel citoplasma (Sangiorgi et al., 1990). Una caratteristica distintiva degli eritroblasti primitivi è che circolano nel sangue embrionale, come cellule nucleate, mentre gli eritroblasti definitivi perdono il nucleo nel fegato fetale, prima di entrare in circolo.

Gli eritroblasti primitivi, isolati dal sangue materno di donne in gravidanza, possiedono nuclei picnotici molto densi ed hanno una morfologia differente rispetto a quelli presenti nel feto, probabilmente a causa della differenza di saturazione dell'ossigeno tra il sangue fetale e quello materno (Babochkina et al., 2005).

Il numero degli eritroblasti fetali circolanti (*NRBC: Nucleated Red Blood Cells*) nel sangue venoso materno è variabile e può essere compreso nell'intervallo tra 1 ogni 10^5 e 1 ogni 10^9 cellule materne (Ganshirt et al., 1990) e tende ad aumentare in relazione all'età gestazionale. Diverse evidenze sperimentali suggeriscono, inoltre, che il numero degli *NRBC* fetali nel sangue materno aumenti notevolmente in caso di feto aneuploide. Questo evento potrebbe essere correlato con l'ultrastruttura che assume la placenta in caso di gravidanza con feto aneuploide o con le dimensioni degli eritrociti che differiscono rispetto a quelle di un feto con cariotipo normale nella stessa epoca gestazionale (Bianchi et al., 1997).

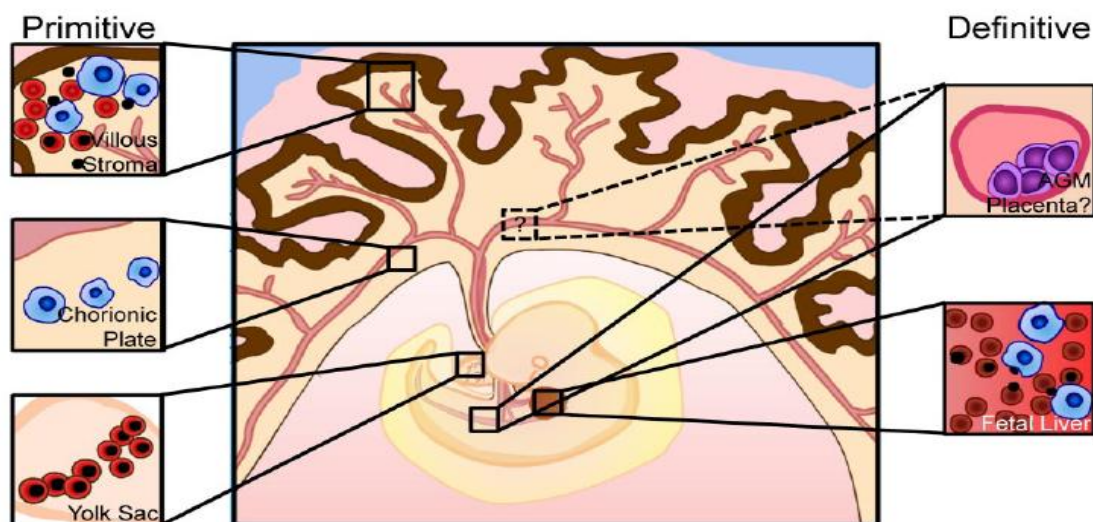


Fig. 1. Modello aggiornato dell'eritropoiesi umana embrionale. Le cellule eritroidi primitive vengono prodotte nel sacco vitellino (in basso a sinistra) e rilasciate nella circolazione prima della loro enucleazione. I macrofagi vengono prodotti nella piastra corionica, migrano verso i villi placentari ed insieme agli eritroblasti primitivi vengono convogliati nello stroma extravascolare dei villi placentari dove, interagendo con essi, ne determinano la loro enucleazione (in alto a sinistra). Allo stesso modo si verifica l'eritropoiesi definitiva nel fegato fetale (in basso a destra) (Van Handel et al., 2010).

Metodi per l'isolamento e l'arricchimento degli eritroblasti fetali

Gli NRBC fetali sono per le caratteristiche su esposte ritenuti il tipo cellulare più appropriato per la NIPD. Il loro studio tuttavia è reso difficile dall'esiguo numero nella circolazione materna. Questo rende necessario lo sviluppo e l'applicazione di numerosi sistemi di arricchimento cellulare quali:

- centrifugazione su gradiente di densità;
- uso di anticorpi di superficie e intracellulari specifici da selezionare attraverso *Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)* o *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)*.

Centrifugazione su gradiente di densità

La prima fase nell'arricchimento degli *NRBC* fetali consiste nell'isolamento delle cellule mononucleate presenti nel sangue materno (monociti, linfociti, eritroblasti) e nell'eliminazione degli eritrociti materni.

A questo scopo viene utilizzata la tecnica di centrifugazione su gradiente di densità, che permette la separazione di macromolecole, o frazioni subcellulari, per mezzo della loro sedimentazione in un gradiente di densità sotto la spinta della forza centrifuga.

I gradienti maggiormente in uso sono stati realizzati utilizzando come polimeri l'Histopaque ed il Percoll a varie densità.

Un esempio di gradiente impiegato per l'isolamento degli *NRBC* fetali è stato proposto recentemente dal gruppo di Choolani il quale ha sviluppato un protocollo sperimentale che prevedeva l'utilizzo del Percoll a densità 1118 g/l, riuscendo a identificare la presenza di una media di 4.5 *NRBC* fetali nel sangue materno (Ponnusamy et al., 2008).

Arricchimento e selezione mediante anticorpi

L'uso di anticorpi di superficie è una delle metodiche maggiormente utilizzate per l'arricchimento degli *NRBC* fetali.

Gli eritroblasti esprimono sulla loro superficie diversi antigeni:

- il recettore per la transferrina (CD71);
- il recettore per la trombospondina (CD36);

- gli antigeni dei diversi gruppi sanguigni (ABO, rhesus, MN, etc.);
- il recettore per l'eritropoietina (Valerio et al., 1996);
- la glicoforina A (GPA);
- HLA-G (Steele et al., 1996).

Gli NRBC fetali furono isolati per la prima volta dalla circolazione materna di donne in gravidanza usando l'anticorpo anti-CD71 (Bianchi et al., 1990), che è presente in tutte le cellule ematopoietiche che incorporano il ferro, come i linfociti, i trofoblasti attivi e tutte le cellule della linea eritroide, dai precursori ai reticolociti (Loken et al., 1987).

L'uso dell'anticorpo anti-CD71 rappresenta ancora oggi la strategia di arricchimento più usata per la selezione positiva degli eritroblasti fetali, pur essendo ampiamente utilizzato anche un altro anticorpo specifico, la glicoforina A. Quest'anticorpo è spesso usato in combinazione con anticorpi non specifici per gli eritroblasti (CD35, CD47 o CD45) che consentono la selezione negativa degli NRBC fetali attraverso la deplezione dei globuli bianchi in massima parte materni.

L'impossibilità di distinguere tra NRBC fetali e materni, costituisce il principale svantaggio di questo protocollo che rappresenta perciò solo un passaggio di arricchimento in cellule fetali (Slunga et al., 1995; Holzgreve et al., 1998). Per l'identificazione specifica delle cellule fetali, sono utilizzati anticorpi intracellulari specifici per le catene globiniche dell'emoglobina embrionaria o fetale. Il primo sito deputato alla sintesi delle catene

globiniche durante lo sviluppo embrionale è il sacco vitellino che sintetizza le catene ζ ed ϵ , che compongono l'emoglobina embrionaria. Il sito principale dell'eritropoiesi, diviene tra la 10^a e la 12^a settimana, il fegato fetale, in cui cessa la sintesi dell'emoglobina embrionaria a favore di quella fetale costituita dalle catene globiniche α e γ .

Uno dei primi anticorpi ad essere impiegato per l'identificazione degli eritroblasti di origine fetale, è stato l'anticorpo specifico per le catene γ globiniche (Zheng et al.1997; Huie et al., 2001), che non è specifico solo per gli eritroblasti fetali, infatti, identifica anche gli eritroblasti materni, che, soprattutto, nelle donne portatrici di β -Talassemia mostrano nel corso della gravidanza, un incremento di HbF (Pembrey et al., 1973).

Allo stesso modo, l'utilizzo di un anticorpo specifico per le catene ζ globiniche, non risulta essere estremamente efficace, poiché queste sono sintetizzate anche nell'adulto portatore di α -Talassemia (Chung et al.,1984).

L'anticorpo maggiormente impiegato per l'isolamento degli eritroblasti fetali da quelli materni, è quello specifico per le catene ϵ dell'emoglobina embrionaria (Mesker et al., 1998; Mavrou et al., 1999).

Gli anticorpi di superficie utilizzati per l'arricchimento sono coniugati a biglie magnetiche o a molecole fluorescenti. Questo rende necessario l'utilizzo di specifiche tecnologie che sfruttano la diversità antigenica della superficie cellulare per la selezione delle diverse popolazioni: il *Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)* ed il *Fluorescence Activated Cell Sorting*

(*FACS*).

Il *MACS* si basa sull'utilizzo di anticorpi coniugati a "biglie" magnetiche, che interagiscono con antigeni specifici espressi sulla superficie cellulare. La soluzione cellulare viene trasferita all'interno di una colonna posizionata in un campo magnetico forte. In questo modo le cellule che esprimono l'antigene e sono quindi coniugate alle biglie, vengono trattenute all'interno della colonna, mentre le altre cellule vengono eluite.

Con questo sistema si possono quindi separare popolazioni cellulari differenti.

Il *FACS* è uno strumento in cui le cellule marcate con anticorpi coniugati a fluorocromi, sono introdotte in un mezzo fluido ed analizzate da un raggio laser. Ogni singola cellula viene attraversata da un fascio di luce che eccita i fluorocromi e determina l'emissione di segnali fluorescenti. Questi segnali vengono raccolti e convertiti in informazioni quantitative e qualitative che sono correlate a caratteristiche e proprietà della cellula. Attraverso piastre di deflessione le cellule analizzate possono essere raccolte separatamente tramite un processo definito *sorting*. In questo modo è possibile analizzare e selezionare le cellule in base a parametri specifici. Il *FACS* è stato a lungo utilizzato in particolare dal gruppo di Diana Bianchi ma i risultati non sono stati sufficientemente incoraggianti. Il limite principale del *FACS*, a parte i costi, è da ricercarsi nella sua scarsa efficienza nel selezionare e raccogliere popolazioni cellulari presenti in percentuali molto basse, quali appunto gli

eritroblasti fetali nel circolo materno.

Il *MACS* invece, oltre ad offrire una metodologia più semplice e meno costosa permette il recupero di un maggior numero di cellule fetali (Bianchi et al., 2002). Il successo di entrambe queste tecniche dipende però essenzialmente dalla specificità dell'anticorpo utilizzato e purtroppo al momento attuale non esiste un anticorpo capace di riconoscere un antigene di superficie specifico per le sole cellule fetali.

Analisi eritroblasti arricchiti dal sangue materno

Una volta isolate ed arricchite le cellule fetali possono essere analizzate utilizzando numerosi metodi in particolare la *Fluorescence in situ hybridisation (FISH)* per la ricerca di aneuploidie e per la determinazione del sesso fetale e metodi basati sulla *Polimerase Chain Reaction (PCR)* per le malattie monogeniche e per altre indagini molecolari.

Queste metodologie in ambito molecolare sono applicate principalmente per:

- individuare la presenza del cromosoma Y per la determinazione del sesso fetale;
- caratterizzare il fattore RhD in caso d'incompatibilità feto-madre;
- identificare mutazioni patologiche in malattie monogeniche;
- stabilire l'origine fetale della cellula isolata attraverso lo studio dei microsatelliti.

Fluorescence in situ Hybridisation (FISH)

La *FISH* viene utilizzata per la diagnosi non invasiva di aneuploidie e per la determinazione del sesso fetale. È una metodologia citogenetica che consente di individuare specifiche sequenze di DNA a livello cromosomico. Il principio su cui si basa è l'ibridazione tra una probe fluorescente (frammento di DNA specifico per la regione di interesse) e la regione cromosomica oggetto di studio fissata su un vetrino.

Il legame della probe al cromosoma viene poi visualizzato mediante l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza.

Polimerase chain reaction (PCR)

La *PCR* rappresenta la strategia principale per l'analisi del DNA estratto dagli eritroblasti fetali poiché consente di ricercare e individuare le mutazioni responsabili dell'insorgenza di malattie monogeniche.

A causa dell'esigua quantità di DNA (5 picogrammi) presente all'interno di una singola cellula si presentano numerose difficoltà durante le procedure di amplificazione. Per superare questo ostacolo sono state messe a punto diverse metodiche di amplificazione dell'intero genoma. Tra queste: la tecnica denominata *Multiple displacement amplification (MDA)* sembra al momento attuale la più efficiente ed affidabile.

Il metodo *MDA* utilizza un set di *primer* degenerati ed una polimerasi (ϕ 29) ad alta processività capace di generare frammenti lunghi circa 10-

50kb. La DNA polimerasi phi29 possiede una più efficiente attività di correzione di bozze con conseguente minore incorporazione di basi nucleotidiche errate nel filamento in crescita.

All'amplificazione dell'intero genoma segue poi l'amplificazione specifica ed il sequenziamento del gene-malattia per la ricerca delle mutazioni responsabili dell'insorgenza della patologia studiata.

L'amplificazione da singola cellula, tuttavia presenta diverse difficoltà correlate alla esigua quantità di DNA a disposizione che possono causare il fallimento della *PCR* e/o la perdita di uno dei due alleli (*allele Dropout ADO*).

Il fallimento dell'amplificazione potrebbe essere causato dalla degradazione del DNA ad opera delle DNasi o dalla inefficiente estrazione del DNA dalla cellula. Le cause che invece determinano *l'ADO* non sono ancora completamente chiare ma potrebbero essere attribuite alle non ottimali condizioni di *PCR* e/o incompleta lisi cellulare.

Diagnosi prenatale mediante l'utilizzo di DNA fetale libero nel plasma materno

Nel 1948, ancor prima della dimostrazione della struttura a doppia elica del DNA da parte di Watson e Crick (1953), venne descritta per la prima volta, la presenza di acidi nucleici liberi nel plasma materno (Mandel et al., 1948). Studi più recenti hanno evidenziato che le cellule tumorali senescenti sono capaci di rilasciare molecole di DNA nella circolazione sanguigna (Stroun et al., 1989).

Partendo da queste conoscenze, nel 1997, il gruppo di Lo riuscì ad amplificare specifiche sequenze del cromosoma Y, dimostrando per la prima volta che il *cffDNA* libero è presente nel plasma di donne in attesa di un feto di sesso maschile (Lo et al., 1997).

Una prima stima della concentrazione del *cffDNA* è stata determinata mediante *real time PCR*. Questo studio ha rivelato che il *cffDNA* aumenta durante la gravidanza in maniera progressiva, partendo da una concentrazione frazionaria media del 3,4% relativa al primo periodo sino al raggiungimento di un valore massimo del 6,2% relativo al termine (Lo et al., 1998).

Un decennio più tardi, utilizzando metodologie di nuova generazione come la *PCR* digitale (*Microfluidics digital PCR*), è stato dimostrato che la

concentrazione effettiva del *cffDNA* nel plasma materno può essere doppia, con una concentrazione media frazionaria del 10% (Lun et al., 2008). Il *cffDNA* ha una emivita di soli 16 minuti e viene rapidamente degradato dopo il parto, escludendo così il rischio di persistenza tra una gravidanza e quella successiva (Lo et al., 1999).

La concentrazione *cffDNA* può subire un notevole incremento anche in relazione a diversi fattori patologici. È stato dimostrato, ad esempio, un aumento significativo della sua concentrazione nel plasma di donne affette da preeclampsia in misura proporzionale alla severità della patologia (Lo et al., 1999). La quantificazione del *cffDNA*, quindi, potrebbe essere utilizzata come marcatore biologico per la previsione dello sviluppo della preeclampsia in popolazioni a rischio (Farina et al., 2004).

Questa non è l'unica complicanza della gravidanza in cui si registra un incremento della concentrazione di *cffDNA* nel plasma materno. Infatti è stato ampiamente dimostrato che sia le procedure diagnostiche invasive utilizzate nel corso della gravidanza (Samura et al., 2003), che la presenza di aneuploidie fetali (ad es. di trisomia 21) o di altre patologie quali l'iperemesi (Sekizawa et al., 2001) e l'emorragia fetomaterna (Lau et al., 2000), possono determinare un incremento della concentrazione del *cffDNA*.

Recenti studi hanno appurato che il *cffDNA* deriva dall'apoptosi dei sinciziotrofoblasti che compongono i tessuti placentari (Flori et al., 2004); è possibile infatti determinarlo in concentrazioni normali nel plasma materno,

anche in caso di gravidanze in cui è presente solo la placenta (Alberry et al., 2007).

Lo nel 2010 ha dimostrato che il sequenziamento del *cffDNA* presente nel plasma di donne in gravidanza, è una rappresentazione esatta dell'intero DNA del feto ed inoltre che il DNA libero di origine materna ha una lunghezza media di 166 bp, mentre il *cffDNA* mostra una prevalenza di frammenti lunghi da 50 bp a 143 bp con una periodicità di 10bp. Le ridotte dimensioni del *cffDNA* sono un'ulteriore convalida della sua origine apoptotica. Questa caratteristica può essere sfruttata per l'isolamento e il suo successivo arricchimento dal plasma materno (Lo et al., 2010).

Diagnosi di sesso e caratterizzazione del fattore RhD

La prima applicazione diagnostica in cui il *cffDNA* nel plasma materno ha trovato impiego, è stata la determinazione del sesso fetale per mezzo di sequenze target ereditate dal feto per via paterna e non presenti nel genoma materno (ad es. sequenze presenti nel cromosoma Y), finalizzata alla diagnosi prenatale di malattie *X-linked* o alla identificazione del gene RHD positivo del feto in madri con RhD negativo.

La determinazione del sesso fetale, viene utilizzata in molti laboratori diagnostici per il suo elevato grado di accuratezza (95%) (Wright and Burton, 2009; Scheffer et al., 2010). Nei casi in cui il feto sia di sesso femminile permette di evitare: un'indagine di tipo invasivo, come nella

diagnosi di malattie *X-linked*, ad esempio la distrofia muscolare di Duchenne e l'emofilia (Costa et al., 2002).

Una diagnosi di sesso maschile può, invece, evitare nell'iperplasia surrenalica congenita, la somministrazione di corticosteroidi alla madre per prevenire la virilizzazione, trattamento che presenta importanti effetti collaterali (Rijnders et al., 2001).

L'identificazione del gene RHD positivo del feto nel plasma delle madri RhD negative è importante per la prevenzione dell'alloimmunizzazione della madre (Lo et al., 1998). Studi eseguiti su larga scala hanno mostrato elevata accuratezza della genotipizzazione fetale RHD che pertanto viene adottata in molti centri diagnostici (Wright et al., 2009; Finning et al., 2008; Van der Schott et al., 2008).

Sebbene la determinazione del sesso fetale e del fattore RhD rappresentino una procedura diagnostica affidabile, la possibilità di un risultato "falso negativo" deve essere tenuta in considerazione. Tale evenienza che si verifica con una frequenza variabile tra il 2 e 5%, può essere dovuta ad una concentrazione di *cffDNA* non rilevabile dalle tecnologie utilizzate, oppure ad una perdita di *cffDNA* durante l'estrazione.

La presenza di una componente fetale in questi protocolli può essere monitorata attraverso lo studio di marcatori epigenetici placentari.

Diversi ricercatori hanno individuato dei marcatori indipendenti dal sesso e dai polimorfismi del feto. Ne sono un esempio i marcatori epigenetici fetali,

che dipendono dalla presenza di differenti pattern di metilazione nel DNA fetale e in quello materno. Nel 2005 Chim fu il primo a dimostrare la presenza di differenze epigenetiche tra le cellule della placenta e quelle ematiche materne (Chim et al., 2005). Dal suo studio è emerso che il promotore del gene *SERPINB5* (*serpin peptidase inhibitor, clade B ovalbumin member 5*) era ipermetilato nelle cellule ematiche materne e ipometilato nella placenta. Monitorandone la presenza nel corso dell'intera gravidanza è stata osservata la sua assenza nel plasma materno 24 ore dopo il parto.

Per l'amplificazione di un gene metilato è necessario l'utilizzo di un processo chimico chiamato "conversione tramite bisolfito" che trasforma le citosine metilate in uracile creando differenze tra la sequenza genetica di molecole di DNA metilato e non metilato. Tuttavia questo trattamento chimico degrada fino al 95% delle molecole di DNA in un campione (Grunau et al., 2001), riducendo notevolmente la quantità di *cffDNA* presente nel plasma materno, determinando così dei risultati falsi negativi.

Di conseguenza i ricercatori hanno cercato di individuare nel plasma materno marcatori fetali epigenetici per i quali non fosse necessaria una conversione tramite bisolfito, ad es. il promotore del gene *RASSF1* (*Ras Association (RalGDS/AF-6) domain Family member 1*), un gene comunemente ipermetilato nella placenta e ipometilato nelle cellule ematiche materne (Chiu et al., 2007). Mediante l'utilizzo di enzimi di

restrizione sensibili alla metilazione può essere rimossa la componente materna, questo permette di lasciare intatta la componente fetale che può essere così quantificata mediante *real time PCR*.

Anche in questo caso è stata osservata la sua assenza nel plasma materno 24 ore dopo il parto, questo conferma che le sequenze ipermetilate RASSF1A presenti nel plasma materno derivano dal feto. L'amplificazione di questo marcatore epigenetico in associazione con lo studio del fattore RhD, potrebbe rappresentare un ottimo sistema di controllo positivo per una *NIPD* del genotipo RHD fetale in donne RhD negative (Chan et al., 2006).

Diagnosi di aneuploidie

L'utilizzo del *cffDNA*, per la *NIPD* della sindrome di Down, rappresenta uno dei traguardi più ambiti, tuttavia lo sviluppo di questa applicazione è molto più complicato rispetto a quella per la determinazione del sesso fetale e del genotipo RHD. Uno dei motivi è che il cromosoma 21, coinvolto nella sindrome di Down, è presente sia nel feto che nella madre, di conseguenza è necessario individuare con estrema sensibilità una minima percentuale di squilibrio nel dosaggio del cromosoma.

Le prime dimostrazioni che gli acidi nucleici presenti nel plasma materno potevano essere utilizzati per l'identificazione di feti con trisomia 21 (Tong et al., 2010) e 18 (Tsui et al., 2010), sono state ottenute grazie agli studi di alcuni marcatori epigenetici, seguendo un approccio quantitativo che

permette di misurare il rapporto tra un marcatore epigenetico fetale, localizzato su un cromosoma aneuploide ed un secondo marcatore su un altro cromosoma fetale definito: *reference chromosome* il quale deve avere un dosaggio normale nel feto.

Per la diagnosi della trisomia 21, il promotore del gene dell'olocarbossilasi sintetasi (*HLCS : holocarboxylase syntetase*) è ipermetilato nella placenta e può essere utilizzato come marcatore epigenetico fetale. L'identificazione della trisomia 21 è stata dimostrata mediante la quantificazione del rapporto tra il gene fetale ipermetilato ed un secondo marcatore localizzato sul cromosoma Y, considerato come cromosoma di riferimento (Tong et al., 2010 Jan). Per estendere l'utilizzo di questa metodica anche ai feti di sesso femminile è stata proposta l'analisi di un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) ereditato per via paterna, mappato su un cromosoma autosomico di riferimento (Tong et al., 2010 Dec). Questo studio è stato condotto grazie all'ausilio di metodologie di nuova generazione come la *PCR* digitale (*microfluidics digital PCR*), un sistema miniaturizzato all'interno del quale ciascun campione di *cffDNA* viene amplificato in migliaia di reazioni in parallelo all'interno di un sistema microfluidico, partendo da singole molecole di DNA. Il rapporto tra cromosoma 21 e quello di riferimento deve risultare elevato nei feti con trisomia 21.

Attualmente, alcune linee di ricerca, si prefiggono lo sviluppo di tecniche di sequenziamento massivo applicate alla *NIDP* della trisomia 21. Con questa

tecnologia è stato possibile mappare l'intero genoma fetale e dimostrare che è rappresentato interamente durante la gravidanza nel plasma materno (Lo et al., 2010).

Il primo studio di questo tipo è stato condotto nel 2011 con una casistica di 576 donne tra la 13^a-15^a settimana di gravidanza ad alto rischio per la trisomia 21. I risultati del sequenziamento sono stati confermati da quelli del cariotipo ottenuti mediante villocentesi ed amniocentesi. Da questo studio è emerso che l'utilizzo del sequenziamento massivo avrebbe potuto evitare il ricorso alle tradizionali procedure diagnostiche invasive nel 98% delle donne in gravidanza studiate; mostrando una sensibilità del 100% ed una specificità del 97.9% (Chiu et al., 2011). Studi simili sono stati condotti anche per le trisomie 18 e 13 che presentavano delle difficoltà iniziali, successivamente risolte con l'uso di particolari algoritmi bioinformatici (Sehnert et al., 2011; Chen et al., 2010).

Nel prossimo futuro, lo studio non invasivo del DNA fetale attraverso il sequenziamento massivo, potrebbe diventare un test di screening prenatale di primo livello (Lo, 2011).

Diagnosi di malattie monogeniche

Con lo sviluppo di avanzate tecnologie che consentono il conteggio di singole molecole di DNA presenti nel plasma materno, sono emerse nuove possibilità anche per una NIPD delle malattie monogeniche, non più

confinata all'identificazione di sequenze di DNA che il feto ha ereditato per via paterna ed assenti nella madre, ma basata sulla possibilità di rilevare il dosaggio di un particolare allele mutato nel feto.

Questo innovativo approccio potrebbe essere applicato anche in tutti quei casi in cui entrambi i genitori sono portatori della stessa mutazione.

Se consideriamo lo scenario in cui la madre è eterozigote per una malattia autosomica recessiva, il rapporto tra gli alleli mutato e normale saranno in equilibrio tra loro (1:1) nel plasma materno. Se madre e feto sono entrambi eterozigoti per la stessa variante genica, anche in questo caso gli alleli mutato e normale quantificati nel plasma materno saranno in equilibrio tra loro (1:1). Al contrario, nel caso in cui il feto sia omozigote per l'allele normale o per quello mutato si osserva uno sbilanciamento negli alleli quantificati nel campione estratto dal plasma materno. La quantificazione di questo sbilanciamento permette di risalire al genotipo fetale. È stato dimostrato che la *PCR* digitale consente di raggiungere la precisione necessaria per questo tipo di analisi (Lun et al., 2008). Questo approccio è stato realizzato con successo per la diagnosi prenatale di emoglobinopatie (Lun et al., 2008) e per l'emofilia (Tsui et al., 2011). Il recente avvento delle tecnologie di sequenziamento massivo del DNA ha fornito un altro metodo efficace per il rilevamento e il conteggio delle singole molecole di DNA presenti nel plasma materno.

Recentemente la *NIPD* di malattie monogeniche, quali la Beta Talassemia, è

stata eseguita sfruttando la tecnologia del sequenziamento massivo, la quale ha permesso di ricostruire gli aplotipi parentali associati alle mutazioni e determinare così il genotipo fetale (Lo et al., 2010).

OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'obiettivo del nostro progetto è stato quello di sviluppare e di validare un protocollo per la *NIPD* di malattie monogeniche attraverso due procedure sperimentali:

- l'isolamento e l'analisi molecolare degli eritroblasti nucleati fetali;
- l'analisi del *cffDNA* nel plasma materno.

PAZIENTI E METODI

In collaborazione con il Servizio di Screening e Consulenza genetica del nostro ospedale, sono state reclutate 95 donne pervenute per sottoporsi a diagnosi prenatale di Beta Talassemia tramite prelievo dei villi coriali, in epoca gestazionale compresa tra la 6^a e la 14^a settimana di gravidanza. Dopo dettagliata esposizione del nostro progetto e firma del consenso informato a ciascuna donna sono stati prelevati in media 15-20 ml di sangue, dei quali:

- 10-15 ml sono stati destinati all'isolamento degli *NRBC* fetali;
- 3-5 ml sono stati utilizzati per l'estrazione del *cffDNA* dal plasma materno.

Isolamento degli eritroblasti fetali dal sangue materno

L'isolamento degli NRBC fetali dal sangue materno prevede i seguenti step:

- separazione e isolamento mediante gradiente di densità;
- arricchimento mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali selettivi e attraverso la tecnica di separazione cellulare che sfrutta il *MACS*;
- identificazione attraverso l'uso di anticorpi fluorescenti diretti contro le catene ϵ dell'emoglobina embrionaria e γ dell'emoglobina fetale;

- allestimento dei vetrini contenenti le cellule fetali ottenute dopo arricchimento;
- isolamento delle cellule fetali fluorescenti utilizzando un microscopio a microdissezione laser;
- lisi delle cellule fetali ed estrazione del DNA;
- identificazione dell'origine fetale della cellula isolata mediante lo studio di sequenze polimorfe (*STR*);
- validazione dei risultati attraverso il confronto con il profilo genetico parentale.

Isolamento degli NRBC fetali

Ad ogni donna che ha aderito al progetto sono stati prelevati 10-15 ml di sangue periferico in EDTA, processati durante le 24 ore successive.

In questo protocollo è stata testata la capacità di arricchimento di due differenti gradienti: il Percoll con densità 1.118g/l e l'Histopaque con densità 1.107 g/l. Il primo è stato ottenuto miscelando 33ml di Percoll 1.130 g/ml con 7.36 ml di NaCl 1.5M, mentre il secondo è stato ottenuto dalla miscela di 35.7 ml di Histopaque 1.119 g/l + 14.3 ml di Histopaque 1.077 g/l.

Il sangue è stato diluito (1:1) con 20 ml di PBS 1x e sottoposto a centrifugazione su gradiente di densità: 5 ml di sangue diluito sono stati stratificati su 5 ml di Percoll 1.118 g/l o Histopaque 1.107 g/l e centrifugati

rispettivamente alla velocità di: 3000rpm (Percoll) o 700 giri (Histopaque) per 25 minuti a 18°-20° C.

Durante la centrifugazione la migrazione differenziale determina la formazione di diversi strati contenenti differenti tipi di cellule: sul fondo della provetta sedimentano gli eritrociti, mentre le cellule mononucleate (linfociti, monociti, eritroblasti) e le piastrine sedimentano nell'interfaccia tra il Percoll o Histopaque ed il plasma.

Dopo aver eliminato il plasma, lo strato contenente le cellule mononucleate è stato raccolto e lavato due volte con PBS 1x e centrifugato a 300 e 200giri per 10 minuti a 18°-20° C allo scopo di eliminare eventuali residui della matrice del gradiente e le piastrine. Di volta in volta abbiamo monitorato la tipologia delle cellule arricchite, una volta fissate su vetrino, utilizzando due distinte colorazioni in base all'epoca gestazionale della paziente:

- la colorazione di May-Grunwald Giemsa (6^a-8^a settimana di gravidanza) (Fig. 2).

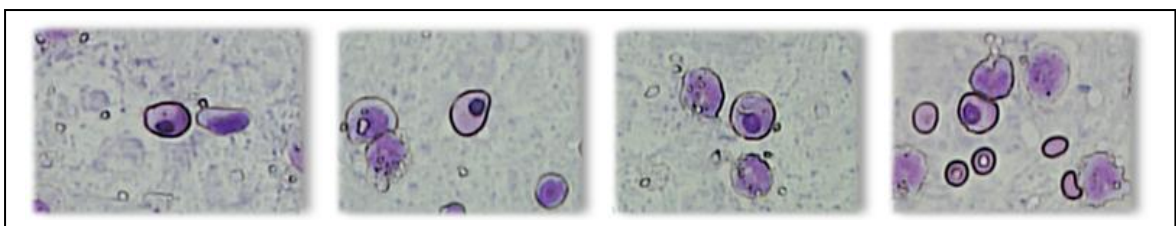


Fig. 2. Cellule colorate con colorazione May-Grunwald Giemsa.

- la colorazione di Kleihauer (8^a-16^a settimana di gravidanza) (Fig. 3)

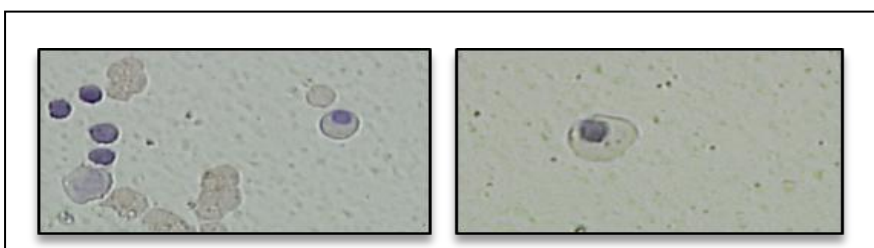


Fig. 3. Cellule colorate con colorazione di Kleihauer.

Le cellule mononucleate così ottenute sono sottoposte a conta mediante l'utilizzo della camera di Burkner e l'impiego della seguente formula matematica: media delle cellule contate/0.1 (spessore vetrino) x 10 (fattore di diluizione) x 1000 μ l.

Arricchimento

Gli *NRBC* fetali sono stati successivamente arricchiti utilizzando l'anti-corpo monoclonale selettivo CD71 (Miltenyi, Biotec, Germany) e selezionati positivamente mediante la tecnica del *MACS* (Miltenyi, Biotec, Germany).

La prima fase dell'arricchimento degli *NRBC* fetali consiste nel risospendere le cellule mononucleate, isolate mediante centrifugazione su gradiente di densità, in 160 μ l di buffer *MACS* (Miltenyi, Biotec, Germany) e aggiungere successivamente 40 μ l dell'anticorpo CD71 coniugato a "biglie" magnetiche.

Il legame dell'anticorpo alla cellula viene favorito dall'incubazione a 4°C per 15 minuti. Le cellule marcate sono poi lavate attraverso l'aggiunta di 1 ml di buffer *MACS* e centrifugate a 300giri per 10 minuti.

La selezione positiva degli eritroblasti fetali avviene utilizzando il *MACS*: le cellule marcate con l'anticorpo CD71 coniugato alle biglie, fluiscono attraverso una colonna collocata tra due magneti. Questi ultimi trattengono

all'interno della colonna tutte le cellule CD71 positive, che esprimono sulla loro superficie il recettore per la transferrina. Le cellule CD71 negative invece non vengono trattenute ed eluiscono facilmente attraverso la colonna durante i lavaggi con il buffer *MACS*. La colonna viene successivamente allontanata dai magneti e le cellule CD71 positive vengono eluite con 500 µl di buffer *MACS* e raccolte in una provetta.

Identificazione degli NRBC fetali

Gli *NRBC* fetali sono identificati e distinti da quelli di origine materna utilizzando due differenti anticorpi (coniugati con composti fluorescenti) in base all'epoca gestazionale della paziente:

- un anticorpo anti catene globiniche ϵ (Hb Gower 1 e 2) (6^a-8^a settimana di gravidanza) marcato con FITC (fluorescina isotiocianata) (Europa Bioproductus.U.S.A.);
- un anticorpo anti catene globiniche γ (HbF) (8^a-16^a settimana di gravidanza) marcato con Ficoeritrina (Invitrogen).

Saggi di immunocitochimica

Anticorpo anti catene globiniche epsilon marcato con FITC

Le cellule isolate e arricchite sono quindi fissate con 250 µl di Inside Fix medium e 250 µl di PBS 1x pH 7.2 +0.5% di BSA + 2 mM di EDTA,

incubate per 20 minuti a temperatura ambiente e centrifugate a 300 giri per 5 minuti. Il supernatante viene eliminato ed il pellet formatosi viene risospeso in 1ml di PBS 1x pH 7.2 +0.5% di BSA + 2 mM di EDTA e centrifugato a 300 giri per 5 minuti. Le cellule sono poi incubate per 1 ora al buio a temperatura ambiente con l'anticorpo anti emoglobina epsilon-Fitc diluito 2:100 in Inside Perm (Miltenyi). Ad avvenuta incubazione viene aggiunto 1 ml di Inside Perm e successivamente centrifugato a 300 giri per 5 minuti. Il supernatante è eliminato e le cellule risospese in 100 µl di PBS.

Anticorpo anti catene gamma coniugato alla Ficoeritrina

Le cellule isolate e arricchite sono fissate con 1 ml di glutaraldeide allo 0.05% , incubate per 10 minuti a temperatura ambiente, lavate con 2 ml di PBS 1x +0.1% di BSA ed infine centrifugate a 600 giri per 5 minuti. Questo passaggio viene ripetuto 3 volte. Il supernatante viene eliminato ed il pellet formatosi viene risospeso in 0.5ml di Triton X-100 allo 1%, incubato per 5 minuti a temperatura ambiente e centrifugato a 600 giri per 5 minuti con l'aggiunta di 2 ml di PBS 1x +0.1% di BSA. Il supernatante viene eliminato ed il pellet formatosi viene risospeso in 70µl PBS 1x +0.1% di BSA e 5µl dell'anticorpo anti catene gamma. Le cellule sono così incubate per 1 ora al buio a temperatura ambiente.

Ad avvenuta incubazione vengono aggiunti 2 ml PBS 1x +0.1% di BSA e successivamente centrifugate a 600 giri per 5 minuti.

Il supernatante è eliminato e le cellule risospese in 100 μ l di PBS.

Le cellule marcate sono infine fissate mediante l'utilizzo della citocentrifuga cytospin (Bioptica) su specifici vetrini dotati di *Fluoropolymer-Membrane* (Leica) (Fig. 4).

Le cellule fetali identificate mediante gli anticorpi fluorescenti specifici sono visualizzate utilizzando un microscopio a microdissezione laser (Leica), microdissezionate da un raggio laser con alta precisione e trasferite semplicemente per forza di gravità in una microprovetta da *PCR* localizzata immediatamente sotto il vetrino.

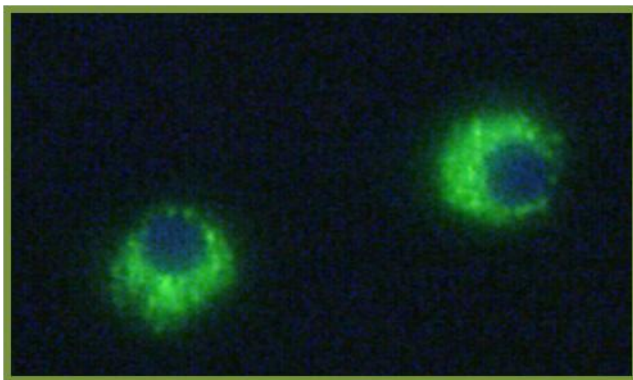


Fig. 4. Cellule fetali identificate attraverso l'anticorpo anti catene globiniche ϵ marcato con FITC.

Lisi cellulare

Le singole cellule fetali isolate e microdissezionate sono sottoposte a lisi enzimatica utilizzando 2 μ l di Proteinasi K ricombinante (10mg/ml) e 8 μ l di TrisEDTA (TE).

Le cellule vengono incubate per 3 ore a 50°C e la Proteinasi K ricombinante

viene inattivata a 99°C per 4 minuti.

Una volta lisate, le cellule vengono poi sottoposte all'analisi di 16 polimorfismi utilizzando un kit (NGM) della Applied Biosystem impiegato in medicina forense e disegnato per lo studio di campioni degradati o complessi.

La reazione di amplificazione è stata realizzata in un volume finale di 25 µl utilizzando: 10 µl di AmpFlSTR NGM Master Mix, 5 µl di AmpFlSTR NGM Primer Set; alla miscela di reazione sono aggiunti 10 µl di lisato cellulare o 10 µl (0.1 ng/µl) del DNA materno e paterno.

Le condizioni utilizzate per l'amplificazione sono: 95°C per 11 minuti; 32 cicli a 94°C per 20 secondi; 59°C per 3 minuti; ed un'estensione finale di 60°C per 10 minuti.

Un'aliquota del prodotto di PCR (1µl) è stata caricata su una piastra da 96 pozzetti insieme a 8.7 µl di formamide e 0.3 µl di GeneScan-500 LIZ Size Standard per essere poi sottoposta ad elettroforesi capillare nel sequenziatore automatico ABI-PRISM 3100 (Applied Biosystem).

L'analisi dei prodotti di amplificazione dei loci polimorfi è stata effettuata con l'utilizzo del programma Gene Mapper.

Il profilo genetico della cellula isolata viene comparato con quello ottenuto dall'analisi dei microsatelliti eseguita utilizzando il DNA materno e paterno.

Analisi del DNA fetale libero nel plasma materno

Lo studio del *cffDNA* è stato articolato nelle seguenti fasi:

- raccolta di sangue periferico delle donne che hanno aderito al progetto;
- separazione del plasma dalla parte corpuscolata del sangue;
- estrazione del *cffDNA* dal plasma materno;
- determinazione del sesso fetale.

Separazione del plasma

Ad ogni donna in gravidanza che ha aderito al progetto sono stati prelevati 3-5 ml di sangue periferico in EDTA; di questi, 2 ml sono stati utilizzati per l'estrazione del *cffDNA*.

Il sangue prelevato è stato quindi sottoposto ad una prima centrifugazione della durata di 10 minuti, alla velocità di 3000 giri, per ottenere la separazione del plasma dalla parte corpuscolata del sangue.

Il plasma separato è stato ulteriormente centrifugato alla velocità di 16000 giri per 45 minuti per eliminare le eventuali cellule ancora presenti. Il supernatante (circa 1 ml) è stato sottoposto immediatamente all'estrazione

del *cffDNA* oppure è stato conservato a -20° C sino al giorno successivo.

Estrazione del DNA fetale

L'estrazione del *cffDNA* è stata eseguita utilizzando il kit Qiaamp Circulating Nucleic Acid della ditta Qiagen.

In una provetta da 15 ml vengono addizionati nel seguente ordine:

- 100 µl di proteinasi K;
- 1 ml di plasma;
- 0.8 ml di buffer ACL contenente 5.6 µg di carrier RNA.

La miscela di questi tre componenti viene omogenata per essere successivamente incubata a 60°C per 30 minuti, per consentire alla proteinasi K e al buffer ACL di inattivare le RNase e rilasciare completamente il DNA dalle proteine e dai lipidi a cui è associato.

Dopo una breve centrifugazione al lisato vengono aggiunti 1.8 ml di buffer ACB che consentirà il legame del DNA alla membrana silicea della colonnina utilizzata per la sua separazione. Segue un'incubazione di 5 minuti in ghiaccio al termine della quale il lisato viene trasferito in una mini colonna collegata ad una pompa a vuoto che, creando un pressione di -800/-900 mbar, consente al DNA di essere adsorbito dalla membrana, mentre tutti i contaminanti vengono eluiti attraverso tre lavaggi successivi eseguiti con 600 µl di buffer ACW1, 750 µl di buffer ACW2 e 750 µl di etanolo assoluto.

La mini colonna contenente il DNA viene rimossa dalla pompa a vuoto, trasferita in una provetta da 2 ml e centrifugata a 20000 giri per 3 minuti per rimuovere eventuali tracce di etanolo assoluto usato precedentemente.

La colonnina viene quindi trasferita in una nuova provetta da 2 ml e incubata a 56°C per 10 minuti per rendere la membrana completamente asciutta. La provetta da 2 ml viene sostituita con un'altra da 1.5 ml e 50 µl di Buffer AVE sono applicati al centro della colonnina per consentire, dopo 3 minuti di incubazione a temperatura ambiente e una centrifugata di 1 minuto a 20000 giri, l'eluizione del DNA adsorbito alla membrana della colonna.

La concentrazione del *cffDNA* estratto dal plasma materno viene calcolata utilizzando la legge di Lambert-Beer:

$c=A/k \cdot d$ dove c =concentrazione DNA (mol/l); A =assorbanza; K =coefficiente d'assorbimento; d =percorso del raggio luminoso (cm).

L'assorbanza viene letta a 260 nm e 280 nm utilizzando lo spettrofotometro "NanoDrop" e successivamente viene calcolato il rapporto tra i due valori ottenuti che offre una stima della purezza del DNA estratto, infatti DNA privi di contaminanti hanno una rapporto 260/280 uguale o inferiore a 1,8.

Determinazione del sesso

Il sesso fetale è stato determinato attraverso l'amplificazione in parallelo di due frammenti del gene TSPY1 che mappa sul cromosoma Y. Per ciascuna reazione di PCR è stata coamplificata, come frammento di controllo per il

monitoraggio della reazione, una regione del gene Beta Globinico.

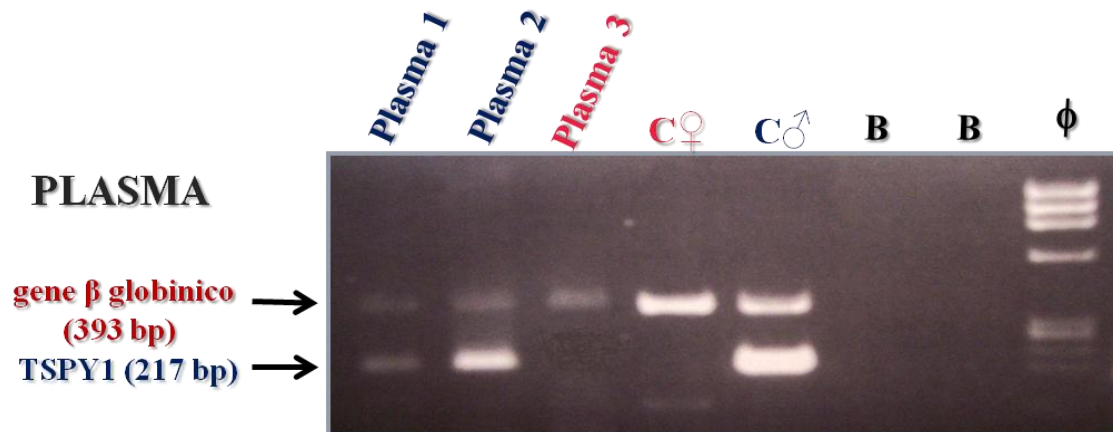


Fig. 5. Determinazione del sesso fetale mediante amplificazione di un frammento di 217 bp del gene TSPY1 e di un frammento di controllo di 393 bp del gene Beta Globinico.

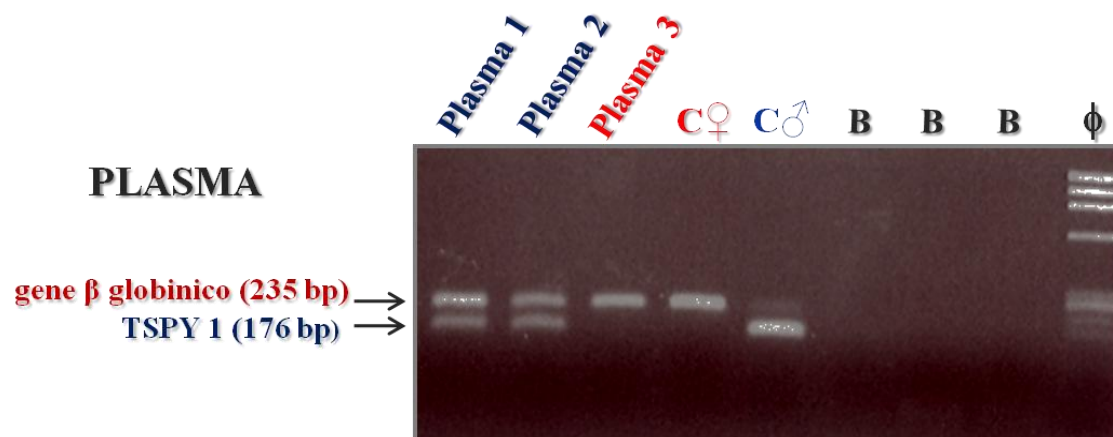


Fig. 6. Determinazione del sesso fetale mediante amplificazione di un frammento di 176 bp del gene TSPY1, interno al frammento di 217 bp della prima reazione e di un frammento di controllo di 235 bp del gene Beta Globinico.

La prima reazione di amplificazione è stata realizzata in un volume finale di 20 µl utilizzando:

300 ng di DNA fetale, 10 µl di HotStarTaqPlus Master mix (Qiagen), 10 pmoli dei primers Y1.5 e Y1.6 (Sigma), 15 pmoli dei primers BETA Forward 1 e BETA Reverse 2, le cui sequenze sono riportate nella tabella 1.

Y 1.5	5'-CTAGACCGCAGAGGGCGCCGT-3'
Y 1.6	5'-TAGTACCCACGCCTGCTCCGG-3'
BETA For 1	5'-GACACAACCTGTGTTCCTACTAGC-3'
BETA Rev 2	5'-GCCATCACTAAAGGCACCG-3'

Tabella 1. Sequenza dei primers utilizzati per l'amplificazione di un frammento di 217 bp del gene TSPY1 e di un frammento di controllo di 393 bp del gene Beta Globinico.

La seconda reazione di amplificazione è stata eseguita anch'essa in un volume finale di 20 µl utilizzando:

300 ng di DNA fetale, 10 µl di HotStarTaqPlus Master mix (Qiagen), 10 pmoli dei primers Y1.7 e Y1.8 (Sigma), 10 pmoli dei primers BETA Forward 3 e BETA Reverse 2, le cui sequenze sono riportate nella tabella 2.

Y 1.7	5'-CATCCAGAGCGTCCCTGGCTT-3'
Y 1.8	5'-CTTTCCACAGCCCACTGGTC-3'
BETA For 3	5'-AAGGAGACCAATAGAACTG-3'
BETA Rev 2	5'-GCCATCACTAAAGGCACCG-3'

Tabella 2. Sequenza dei primers utilizzati per l'amplificazione di un frammento di 176 bp del gene TSPY1 e di un frammento di controllo di 235 bp del gene Beta Globinico.

Le reazioni di amplificazione sono state eseguite in un termociclatore Verity (Applied Biosystem) utilizzando le seguenti condizioni:

95°C per 5 minuti; 40 cicli a 94°C per 30 secondi; 57°C per 30 secondi; 72°C per 1 minuto; un'estensione finale di 72°C per 10 minuti.

La prima reazione coamplifica un frammento di 217 bp del gene TSPY1 e un frammento di 393 bp del gene Beta Globinico (Fig. 5).

La seconda reazione coamplifica un frammento di 176 bp del gene TSPY1, interno al frammento di 217 bp della prima reazione, ed un frammento di 235 bp del gene Beta Globinico (Fig. 6).

I prodotti dell'amplificazione sono stati sottoposti a migrazione elettroforetica su gel di agarosio concentrato al 2% ed evidenziati al transilluminatore a raggi UV attraverso colorazione del gel con bromuro di etidio.

Per avere ulteriore conferma dei risultati ottenuti è stato amplificato, per ciascun campione, un frammento del gene SRY che mappa in una regione diversa del cromosoma Y ed un frammento di controllo del gene HTR2C che mappa sul cromosoma X.

La reazione di amplificazione è stata realizzata in un volume finale di 20 μ l utilizzando:

300 ng di DNA fetale, 10 μ l di HotStarTaqPlus Master mix (Qiagen), 10 pmoli dei primers SRY Forward e SRY Reverse (Sigma), 10 pmoli dei primers HTR2C Forward e HTR2C Reverse, le cui sequenze sono riportate nella tabella 3.

SRY For	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAATAAGTATCGACCTCGTCGGAA-3'
SRY Rev	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGGAGACACTTCGCTGCAGAGTACCGA-3'
HTR2C For	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGGTTTCAGATCGCAGTAA-3'
HTR2C Rev	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGGAGAATATCCATCACGTAGATGAGAA-3'

Tabella 3. Sequenza dei primers utilizzati per l'amplificazione di un frammento di 138 bp del gene SRY1 e di un frammento di controllo di 204 bp del gene HTR2C, che mappa sul cromosoma X.

Le reazioni di amplificazione sono state realizzate utilizzando il termociclatore "Verity" (Applied Biosystem) e sfruttano le seguenti condizioni:

95°C per 15 minuti; 15 cicli a 95°C per 30 secondi; 64°C per 30 secondi; 68°C per 1 minuto.

Nel corso di questi primi 15 cicli la temperatura di ibridazione è stata ridotta di 0.5°C per ciclo.

Seguono 25 cicli a 95°C per 30 secondi; 56°C per 30 secondi; 68°C per 1 minuto; un'estensione finale di 72°C per 10 minuti.

La reazione di amplificazione genera un prodotto di 138 bp del gene SRY ed un prodotto di 204 bp del gene HTR2C (Fig. 7).

I prodotti di amplificazione sono stati sottoposti a migrazione elettroforetica su gel di agarosio concentrato al 2% ed evidenziati al transilluminatore a raggi UV attraverso colorazione del gel con bromuro di etidio.

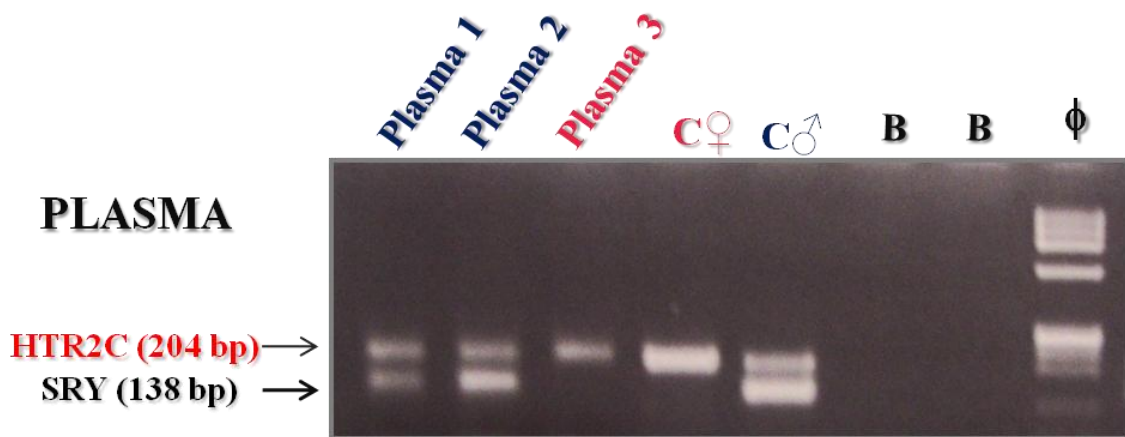


Fig.7. Determinazione del sesso fetale mediante amplificazione di un frammento di 138 bp del gene SRY e di un frammento di controllo di 204 bp del gene HTR2C, che mappa sul cromosoma X.

Il sesso fetale è stato identificato anche mediante l'impiego del kit "AmpFISTR Y-FILER" (Applied Biosystem) che consente di amplificare contemporaneamente, in una singola reazione di PCR, 16 loci polimorfi mappati sul cromosoma Y, sono riportati nella tabella 4.

DYS456	DYS391
DYS3891	DYS439
DYS390	DYS635 (YGATAC4)
DYS38911	DYS392
DYS458	Y GATA H4
DYS19	DYS438
DYS385	DYS437
DYS393	DYS448

Tabella 4. I 16 loci polimorfi mappati sul cromosoma Y e analizzati attraverso Y-FILER.

Ad eccezione dei loci DYS392, DYS438 e DYS448, che sono rappresentati rispettivamente da ripetizioni trinucleotidiche, pentanucleotidiche e esanucleotidiche, i rimanenti loci sono rappresentati da corte ripetizioni tetranucleotidiche (STR).

La reazione di amplificazione è stata realizzata in un volume finale di 25 μ l utilizzando:

9.2 μ l di AmpFlSTR Yfiler Kit PCR Reaction Mix, 5 μ l di AmpFlSTR Yfiler Kit Primer Set, 0.8 μ l di AmpliTaq Gold DNA Polymerase.

Alla miscela di reazione sono aggiunti 500 ng del DNA fetale estratto dal plasma o 10 μ l (0.1 ng/ μ l) del DNA paterno.

Le condizioni utilizzate per l'amplificazione sono:

95°C per 11 minuti; 30 cicli a 94°C per 1 minuto; 61°C per 1 minuto; 72°C per 1 minuto; un'estensione finale di 60°C per 80 minuti.

Un'aliquota del prodotto di PCR (1 μ l) è stata caricata su una piastra da 96 pozzetti insieme a 8.7 μ l di Hi-Di formamide e 0.3 μ l di GeneScan-500 LIZ Size Standard per essere poi sottoposta ad elettroforesi capillare nel sequenziatore automatico ABI-PRISM 3100 (Applied Biosystem) (Fig. 8 e 9).

L'analisi dei prodotti di amplificazione dei loci polimorfi è stata effettuata con l'utilizzo del programma Gene Mapper.

Tutti i risultati ottenuti sui campioni di DNA fetale estratto dal plasma materno sono stati confrontati e validati attraverso l'amplificazione delle

stesse regioni del cromosoma Y nei corrispondenti campioni di DNA fetale estratti dai villi coriali.

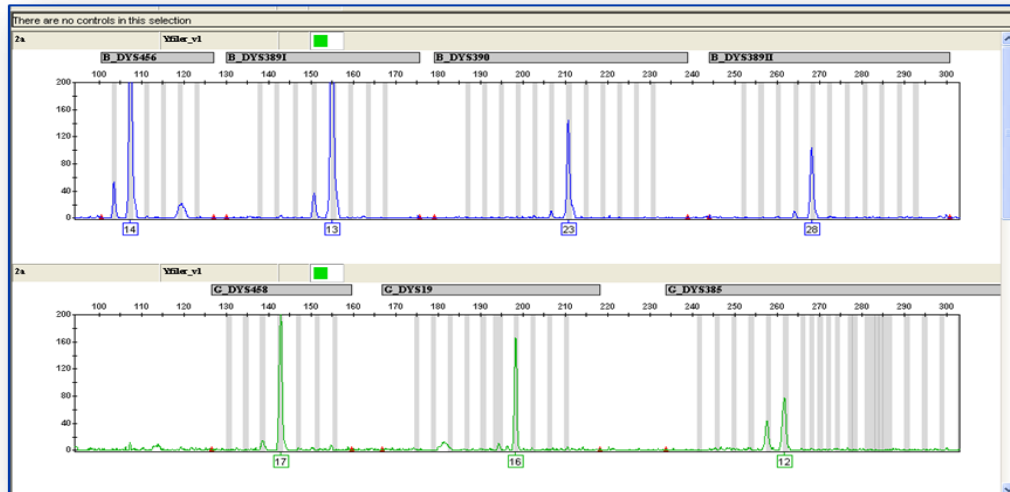


Fig. 8. (500ng cffDNA). Amplificazione dei 7/7 loci polimorfi mediante impiego del kit “AmpFISTR® Y filer.

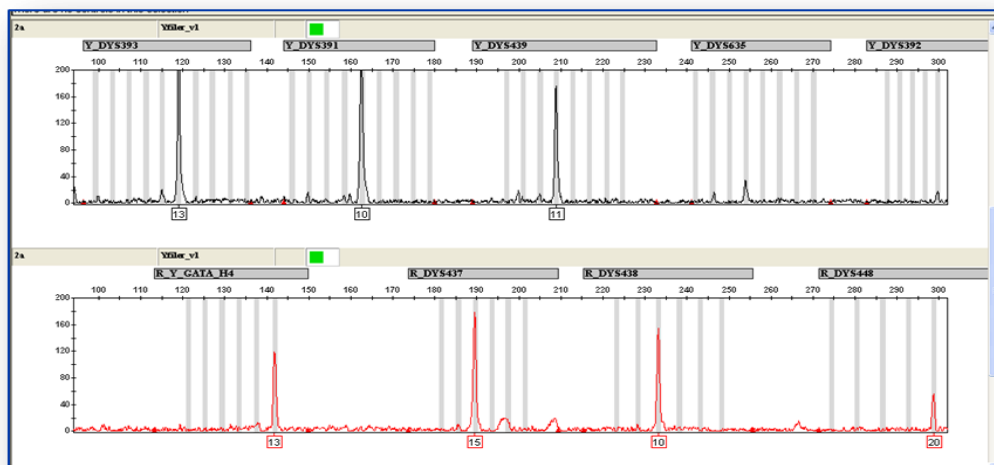


Fig. 9. (500ng cffDNA). Amplificazione dei 7/9 loci polimorfi mediante impiego del kit “AmpFISTR® Y filer.

RISULTATI

Identificazione di cellule fetali nel circolo materno

Nel corso di questo progetto sono state selezionate 95 donne portatrici di Beta Talassemia, con un'età compresa tra i 18 e i 43 anni, in epoca gestazionale tra la 6^a e la 14^a settimana, recatesi nel nostro ospedale per sottoporsi a diagnosi prenatale tramite prelievo dei villi coriali. A ciascuna di esse sono stati prelevati in media 15-20 ml di sangue; di questi circa 10-15 ml sono stati destinati all'isolamento degli *NRBC* fetali e i restanti 3-5 ml sono stati utilizzati per l'estrazione del *cffDNA* dal plasma materno.

Il sangue prelevato da ciascuna paziente inizialmente è stato sottoposto a separazione ed isolamento degli *NRBC* fetali mediante gradiente di densità. Successivamente gli *NRBC* fetali sono stati arricchiti mediante l'uso di anticorpi monoclonali legati a biglie magnetiche e della tecnica di separazione cellulare che sfrutta il *MACS*. Gli *NRBC* fetali selezionati sono stati incubati con anticorpi fluorescenti anti catene globiniche ϵ dell'emoglobina embrionaria o catene γ dell'emoglobina fetale; fissati su appositi vetrini, visualizzati attraverso la microscopia a fluorescenza LMD, microdissezionate con un raggio laser e trasferite per forza di gravità in una microprovetta per *PCR* dove sono state lisate e sottoposte ad analisi dei

microsatelliti.

Il protocollo da noi sviluppato per l'isolamento e l'analisi degli *NRBC* fetali presenti nel sangue materno, necessita ancora di importanti modifiche a causa delle difficoltà incontrate nella standardizzazione e nella ripetibilità dei risultati ottenuti. Il ritrovamento di cellule fetali è stato infatti raro e discontinuo a causa dei seguenti punti critici:

- esiguo numero di *NRBC* fetali presenti nel circolo venoso materno che subisce un ulteriore decremento durante le fasi d'arricchimento;
- mancanza di un anticorpo capace di riconoscere un antigene di superficie specifico per le sole cellule fetali;
- marcatura aspecifica delle cellule materne dovuta al legame aspecifico tra il FITC libero (carico negativamente) e i granuli degli eosinofili (carichi positivamente);
- perdita delle cellule durante la microdissezione laser;
- formazione di legami crociati DNA-DNA, DNA-proteine, DNA-proteine istoniche a causa degli agenti fissativi utilizzati durante le fasi di marcatura, che inficiano le reazioni di *PCR* (Balogu et al., 2008);
- perdita di uno dei due alleli (*ADO*);
- epoca gestazionale precoce in cui vengono analizzati i campioni.

DNA fetale libero nel plasma materno

A ciascuna donna sono stati prelevati 3-5 ml ed utilizzati per l'estrazione del *cffDNA* dal plasma materno.

Successivamente è stato estratto il *cffDNA* ed identificato il sesso del feto mediante l'amplificazione, in tre reazioni distinte, dei geni TSPY1 e SR Y, che mappano in regioni diverse del cromosoma Y. In tutte e tre i casi è stato coamplificato un frammento di controllo (il gene Beta Globinico, che mappa sul cromosoma 11, o il gene HTR2C, che mappa invece sul cromosoma X) per il monitoraggio della reazione.

La determinazione del sesso maschile avviene attraverso la coamplificazione dei frammenti del gene TSPY1 o SR Y e del frammento di controllo (gene Beta Globinico o HTR2C). Al contrario, la determinazione del sesso femminile, è correlata alla presenza della sola regione di controllo (gene Beta Globinico o HTR2C).

Queste reazioni di amplificazione hanno consentito di identificare, tra i 95 campioni di plasma materno analizzati, 54 campioni di DNA fetale di sesso maschile e 41 di sesso femminile.

Nei 54 campioni di sesso maschile il risultato è stato confermato nel DNA fetale estratto dai villi coriali. Dei 41 campioni di sesso femminile, 39 hanno trovato conferma nell'analisi molecolare nel DNA estratto dai villi, mentre i 2 campioni residui sono risultati falsi negativi. Dei 93 campioni confermati 6

appartenevano a pazienti pervenute al nostro centro per effettuare una diagnosi prenatale di malattie *X-linked* (X fragile, Distrofia muscolare di Duchenne, S.di Lowe e S. di Hunter) (Fig. 10).

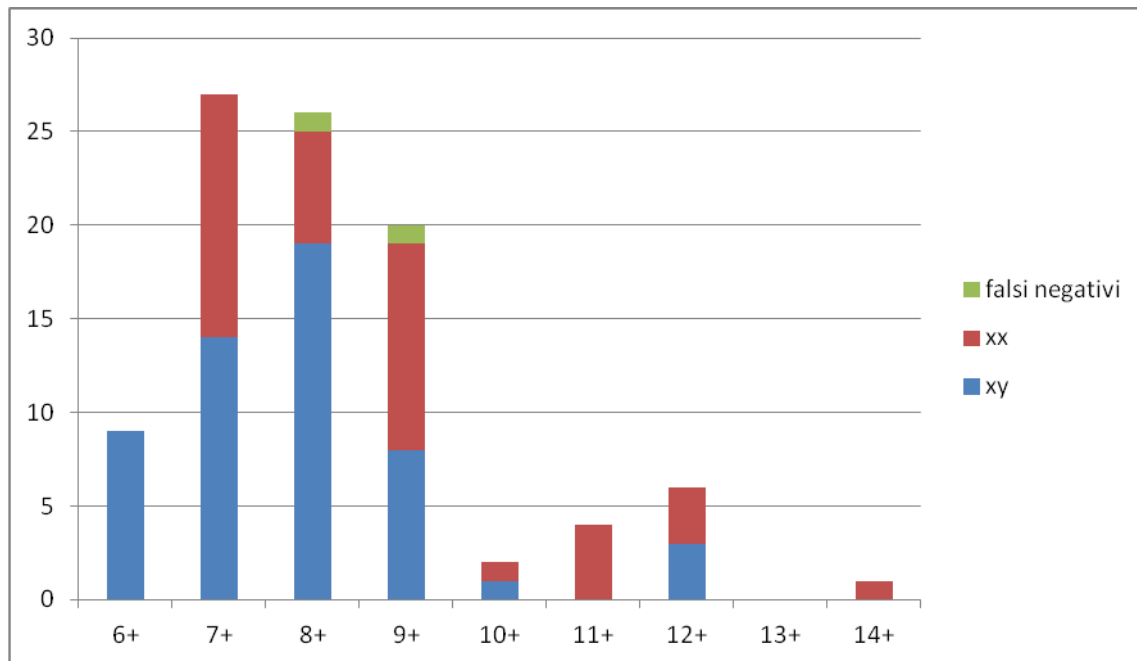


Fig. 10. Distribuzione dei campioni di DNA fetale di sesso femminile e maschile nelle varie settimane di gravidanza in cui sono stati analizzati i campioni di plasma materno.

Possiamo quindi affermare che la metodica utilizzata per l'identificazione del sesso fetale dal DNA estratto dal plasma materno ha sinora mostrato una sensibilità del 96% ed una specificità del 100%. Le reazioni di amplificazione dei due frammenti del gene TSPY1 e di un frammento del gene SRY hanno rivelato valori differenti di sensibilità (Fig. 11).

A differenza di SRY, TSPY1 è un gene multicopia e la sua reazione di amplificazione risulta perciò notevolmente più sensibile. La sensibilità dell'amplificazione del gene SRY invece aumenta con il procedere delle settimane di gestazione e quindi con l'incremento della concentrazione di

cffDNA nel plasma materno.

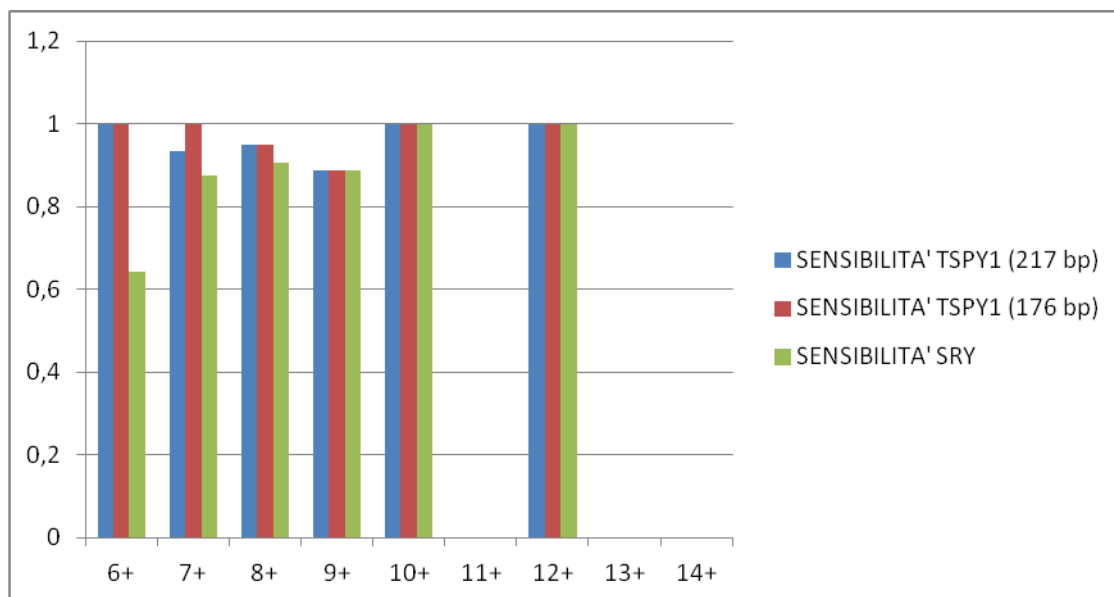


Fig. 11. Valori di sensibilità delle reazioni di amplificazione del gene TSPY1 ed SRY.

L'amplificazione dei microsatelliti del cromosoma Y ci ha consentito di ottenere una conferma dei risultati acquisiti con lo studio molecolare dei geni TSPY1 e SRY e, inoltre, di stabilire una stima approssimativa del rapporto tra la concentrazione del *cffDNA* e quella del DNA materno nel plasma delle donne in gravidanza che hanno aderito al nostro progetto. Questo rapporto è stimato intorno all'1:500 in quanto, nella maggior parte dei campioni analizzati, è stato necessario utilizzare circa 500 ng del *cffDNA* estratto dal plasma per poter amplificare tutti i microsatelliti mappati sul cromosoma Y e previsti dal kit.

CONCLUSIONI

La diagnosi genetica prenatale è l'insieme delle indagini diagnostiche, strumentali e di laboratorio che permette di individuare la presenza di malattie monogeniche e di alterazioni cromosomiche nel feto prima della nascita. Il perfezionamento delle tecniche di prelievo del materiale fetale attraverso l'amniocentesi e la villocentesi, parallelamente allo sviluppo dei metodi di indagine per lo studio del DNA e per l'analisi del cariotipo, ha fornito, nel corso degli ultimi trent'anni, un importante strumento di prevenzione per le coppie a rischio per malattie genetiche. Negli ultimi decenni sono state sviluppate importanti linee di ricerca che hanno aperto nuove prospettive nel campo della diagnosi prenatale non invasiva in epoca gestazionale precoce, sia per la diagnosi delle aneuploidie che delle malattie monogeniche.

In particolare, è stata dimostrata la presenza di cellule fetali nella circolazione periferica materna e, inoltre, è stata documentata la presenza di *cffDNA*, fin dalle prime settimane di gravidanza.

Il protocollo da noi sviluppato per l'isolamento e l'analisi degli *NRBC* fetali presenti nel sangue materno, necessita ancora di importanti modifiche a causa delle difficoltà incontrate nella standardizzazione e nella riproducibilità dei risultati.

L'ostacolo maggiore è rappresentato dall'esiguo numero degli *NRBC* fetali presenti nel circolo materno, il quale subisce un ulteriore decremento durante le fasi di arricchimento. L'anticorpo fluorescente che lega le catene è risultato non essere specifico per le sole cellule di origine fetale in quanto, sono state marcate in modo aspecifico anche cellule eosinofile di origine materna a causa del legame aspecifico del FITC libero (carico negativamente) ed i granuli degli eosinofili (carichi positivamente).

Numerose difficoltà sono state riscontrate anche durante le fasi di amplificazione del DNA fetale estratto da singola cellula dovute alla sua esigua quantità (5 picogrammi), all'utilizzo degli agenti fissativi durante le fasi di marcatura che causano la formazione di legami crociati tra DNA-DNA e DNA-proteine ed infine alla perdita di uno dei due alleli.

Il superamento di queste difficoltà ed il miglioramento del protocollo da noi utilizzato per la ricerca e l'analisi molecolare degli eritroblasti fetali, consentirà alle coppie a rischio di malattie genetiche di poter anticipare notevolmente i tempi della diagnosi alla 6^a-8^a settimana di gravidanza ed eviterebbe il rischio di perdita fetale.

La grande difficoltà di impiegare le cellule fetali nella pratica diagnostica, ha

orientato numerosi gruppi di ricerca compreso il nostro verso lo studio del DNA fetale libero presente nel plasma materno.

La scoperta della presenza del DNA fetale nel circolo materno risale al 1997, quando Lo ed i suoi collaboratori, riuscirono ad amplificare specifiche sequenze del cromosoma Y, dimostrando così la presenza di DNA fetale libero nel plasma di donne in attesa di un feto di sesso maschile durante le prime settimane di gestazione.

In letteratura sono state descritte diverse importanti caratteristiche del *cffDNA* come: le sue dimensioni, lo stato di metilazione di alcune regioni geniche, il progressivo aumento della sua concentrazione durante l'intera gravidanza in presenza di alcune aneuploidie fetali. Un gran numero di studi sono stati condotti, finalizzati a provare la sua reale applicabilità nella diagnosi non invasiva di malattie genetiche. Le prime applicazioni diagnostiche in cui il *cffDNA* libero nel plasma materno ha trovato impiego, sono state la determinazione del sesso fetale finalizzata alla diagnosi prenatale di malattie *X-linked* e l'identificazione del gene RhD positivo del feto in madri con RhD negativo; data la loro alta percentuale di accuratezza attualmente vengono eseguite in certo numero di laboratori diagnostici in Europa.

Il suo impiego per la diagnosi delle aneuploidie cromosomiche (es. trisomia 21) è stato fin dall'inizio tecnicamente più impegnativo per la necessità di individuare con estrema sensibilità una minima percentuale di squilibrio nel

dosaggio di un cromosoma. Inizialmente nel 2007 Lo ed i suoi collaboratori sostenevano che un tale livello di sensibilità poteva essere raggiunto grazie all'utilizzo di nuove tecniche molecolari come la *PCR* digitale che permette il conteggio di singole molecole di DNA. Un simile approccio risultava essere estremamente laborioso e solo negli anni successivi è stato sviluppato un sistema più efficiente per l'analisi di milioni di molecole di DNA. Nel 2011 studi su larga scala hanno dimostrato la possibilità di applicare con un discreto successo il sequenziamento massivo del DNA per la *NIPD* della trisomia 21.

L'obiettivo del nostro progetto è stato lo studio del *cffDNA* estratto dal plasma materno in un campione di 95 donne tra la 6^a e la 14^a settimana di gravidanza, recatesi nel nostro centro per sottoporsi a diagnosi prenatale di Beta Talassemia, fibrosi cistica e patologie X-linked (X fragile, Distrofia muscolare di Duchenne, S.di Lowe e S. di Hunter) mediante prelievo dei villi coriali.

Il *cffDNA* estratto è stato amplificato per la determinazione del sesso fetale e i risultati ottenuti sono stati confermati con l'analisi dei villi coriali.

Attraverso l'applicazione del protocollo da noi sviluppato, è stato possibile, determinare con successo il sesso fetale in 93 donne in epoca gestazionale precoce. Dei 93 campioni confermati, 6 appartenevano a pazienti pervenute al nostro centro per effettuare una diagnosi prenatale di malattie *X-linked* (X fragile, Distrofia muscolare di Duchenne, S.di Lowe e S. di Hunter) La

nostra metodica ha dimostrato un'affidabile riproducibilità con una specificità del 100% ed una sensibilità del 96 %. In 2 campioni di sesso maschile non è stata individuata la presenza del cromosoma Y (falsi negativi) probabilmente a causa della minore concentrazione del DNA fetale nel plasma materno oppure della ridotta efficienza della metodica di estrazione del DNA fetale dal plasma.

Forti dei risultati ottenuti, riteniamo che nel prossimo futuro questo protocollo possa essere utilizzato per la *NIPD* di patologie *X-linked*, evitando una diagnosi prenatale di tipo invasivo alle donne in attesa di un feto di sesso femminile.

Per quanto concerne la *NIPD* da *cffDNA* nelle malattie monogeniche, il nostro progetto prevede la sua applicazione sulla Beta Talassemia che in Sardegna ha una marcata omogeneità genetica. Per superare questa problematica pensiamo di sviluppare nel prossimo futuro un modello di *NIPD* utilizzando la tecnologia del sequenziamento massivo.

In particolare il progetto prevede l'amplificazione selettiva delle regioni geniche di interesse (gene Beta Globinico) a rischio di mutazioni patologiche e di regioni localizzate sui cromosomi sessuali (X e Y), per la simultanea identificazione del sesso. La selezione di tali regioni sarà eseguita in modo da includere regioni adiacenti a quelle di interesse diagnostico, che siano ricche di polimorfismi a singolo nucleotide (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) e che consentano di discriminare gli aplotipi parentali

associati alle mutazioni patologiche. Nel nostro caso ad esempio pensiamo di includere alcune sequenze polimorfe localizzate nel cluster del gene Beta Globinico ed eventuali geni polimorfi (es zfy/zfx) presenti nei cromosomi sessuali.

Attraverso l'applicazione di questo protocollo dovremmo essere in grado di quantificare eventuali sbilanciamenti presenti nelle regioni sequenziate e di determinare la quantità di copie degli alleli normali e/o mutati dei geni Beta Globinici e dei geni localizzati sui cromosomi sessuali fetali, presenti nel plasma materno. La quantificazione ci permetterà di risalire al genotipo fetale, inoltre tutte le varianti alleliche di origine paterna, distinguibili da quelle materne, potranno essere utilizzate per verificare la presenza del DNA fetale nel campione estratto dal plasma e quantificare la quota fetale rispetto a quella materna aumentando il potere diagnostico della nostra piattaforma.

BIBLIOGRAFIA

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 May; 27(5): 415-8.

Babochkina T, Meregenthaler S, De Napoli G, Hristoskova S, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S. *Numerous erythroblasts in maternal blood are impervious to fluorescent in situ hybridization analysis, a feature related to a dense compact nucleus with apoptotic character*. Hematologica 2005; 90:740-745.

Baloglu G, Haholu A, Kucukodaci Z, Yilmaz I, Yildirim S, Baloglu H. *The effects of tissue fixation alternatives on DNA content: a study on normal colon tissue*. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2008 Oct; 16(5):485-92.

Bianchi DW, Flint FA, Pizzimenti MF, J Knoll JH, Latt SA. *Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood*. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:3279-3283.

Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester s, DeMaria MA. *Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum*. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:705-708.

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 Hun 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; 22:609–615.

Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam SS. *Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts*. Hum Reprod 1994; 9:2110-2117.

Brambati B, Simoni G. *Diagnosis of fetal trisomy 21 in first Trimester*. Lancet 1983 Mar 12;1:586.

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 noninvasive prenatal diagnosis*. Clin Chem 2006; 52(12):2211-8.

Chen EZ, Chiu RW, Sun H, Akolekar R, Chan KC, Leung TY, Jiang P, Zheng YW, Lun FM, Chan LY, Jin Y, Go AT, Lau ET, To WW, Leung WC, Tang RY, Au-Yeung SK, Lam H, Kung YY, Zhang X, van Vugt JM, Minekawa R, Tang MH, Wang J, Oudejans CB, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM. *Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing*. PLoS One 2011; 6(7):e21791.

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 USA 2005; 102:14753e8.

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(3):941-50.

Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, Leung TY, Sun H, Chan KC, Lun FM, Go AT, Lau ET, To WW, Leung WC, Tang RY, Au-Yeung SK, Lam H, Kung YY, Zhang X, van Vugt JM, Min ekawa R, Tang MH, Wang J, Oudejans CB, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM. *Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study*. BMJ 2011 Jan 11; 342:c7401.

Choi K, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. *A common precursor for hematopoietic and endothelial cells*. Development 1998; 125:725-732.

Chung, S.W., Wong SC, Clarke BJ, Patterson M., Walker WH, and. Chui

DH. *Human embryonic zeta-globin chains in adult patients with alphas-thalassaemias*. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81:6188-6191.

Collins SL, Impey L. *Prenatal diagnosis: types and techniques*. Early Hum Dev 2012 Jan; 88(1):3-8.

Costa JM, Benachi A, Gautier E. *New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders*. N Engl J Med 2002; 346:1502.

Covone AE, Mutton D, Johnson PM, Adinolfi M. et al. *Trophoblast cells in peripheral blood from pregnant women*. Lancet 1984; 2: 841-843.

De la Chapelle A, Fantoni A, Marks P. *Differentiation of mammalian somatic cells: DNA and hemoglobin synthesis in fetal mouse yolk sac erythroid cells*. Proc Natl Acad Sci USA 1969; 63:812-819.

Douglas GW, Thomas L, Carr M, Cullen NM, Morris R. *Trophoblast in the circulation blood during pregnancy*. Am J Obstet Gynecol 1959; 78:960-973.

Ema M, Yokomizo T, Wakamatsu A, Terunuma T, Yamamoto M, Takahashi S. *Primitive erythropoiesis from mesodermal precursors expressing VE-cadherin, PECAM-1, Tie2, endoglin, and CD34 in the mouse embryo*. Blood 2006; 108:4018-4024.

Farina A, Sekizawa A, Sugito Y, Iwasaki M, Saito H, Okai T. *Fetal DNA in maternal plasma as a screening variable for preeclampsia. A preliminary nonparametric analysis of detection rate in low-risk nonsymptomatic patients*. Prenat Diagn 2004; 24(2):83-6.

Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. *Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study*. BMJ 2008; 336:816-8.

Flori E, Doray B, Gautier E, Kohler M, Ernault P, Flori J, Costa JM. *Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto-and syncytio-trophoblastic cells*. Case report. Human Reprod 2004 Mar; 19(3):723-4.

Fraser ST, Iserm J, Baron MH. *Maturation and enucleation of primitive erythroblasts during mouse embryogenesis is accompanied by changes in cell surface antigen expression.* Blood 2007; 109:343-352.

Ganshirt-Ahlert D, Pohlschmidt M, Gal A, Miny P, Horst J, Holzgreve W. *Ratio of fetal to maternal DNA is less than 1 in 5000 at different gestational ages in maternal blood.* Clin Genet 1990; 38:38-43.

Ganshirt D, Garritsen H, Miny P, Holzgreve W. *Fetal cells in maternal circulation throughout gestation.* Lancet 1994; 343: 1038-1039.

Grati FR, Barlocco A, Grimi B, Milani S, Frascoli G, Di Meco AM, Liuti R, Trotta A, Chinetti S, Dulcetti F, Ruggeri Am, De Toffol S, Clementi M, Maggi F, Simoni G. *Chromosome abnormalities investigated by non-invasive prenatal testing account for approximately 50% of fetal unbalances associated with relevant clinical phenotypes.* Am J Med Genet A. 2010 Jun; 152°(6): 1434-42.

Goldberg JD, Wohlferd MM. *Incidence and outcome of chromosomal mosaicism found at the time of chorionic villus sampling.* Am J Obstet Gynecol 1997; 176:1349-52.

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

Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. *Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters.* Nucleic Acids Res 2001; 29(13): E65-5.

Henderson KG, Shaw TE, Barrett IJ, Telenius AH, Wilson RD, Kalousek DK. *Distribution of mosaicism in human placentae.* Hum Genet 1996; 97:650-654.

Henery CC, Kaufman MH. *Relationship between cell size and nuclear volume in nucleated red blood of developmentally matched diploid and tetraploid mouse embryos.* J Exp Zool 1992; 261:472-478.

Holzgreve W, Ghezzi F, Di Naro E, Gänshirt D, Maymon E, Hahn S.

Disturbed feto-maternal cell traffic in preeclampsia. Obstet Gynecol 1998 May; 91(5 Pt 1):669-72.

Hsieh TT, Pao CC, Hor JJ, Kao SM. *Presence of fetal cells in maternal circulation after delivery.* Hum Gen 1993; 92:204-205.

Huie, M. A., M. C. Cheung, M. O. Muench, B. Becerril, Y. W. Kan, and J. D. Marks. 2001. *Antibodies to human fetal erythroid cells from a nonimmune phage antibody library.* Proc. Natl. Acad Sci USA 98:2682-2687.

Kingsley PD, Malik J, Fantauzzo KA, Palis J. *Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis.* Blood 2004; 104:19-25.

Kuliev AM, Modell B, Jackson L, Simpson JL, Brambati b, Rhoads G, Froster U, Verlinsky Y, Smidt-Jensen S, Holzgreve W, Ginsberg N, Ammala P, Dumez Y. *Risk evaluation of CVS.* 1993; Prenat Diagn 13:197-209.

Lau TK, Lo KW, Chan LY, Leung TY, Lo YM. *Cell-free fetal deoxyribonucleic acid in maternal circulation as a marker of fetal-maternal hemorrhage in patients undergoing external cephalic version near term.* AmJ Obstet Gynecol 2000; 183: 712-6.

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; 350:485-487.

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: implication for non invasive prenatal diagnosis.* Am J Hum Gen 1998; 62: 768-775.

Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PM, Redman CW, Wainscoat JS. *Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma.* N Engl J Med. 1998 Dec 10; 339(24):1734-8.

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.

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* 1999 Feb; 45(2):184-8.

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 USA* 2007 Aug 7; 104(32):13116-21.

Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, Zheng YW, Leung TY, Lau TK, Cantor CR, Chiu RW. *Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. Sci Transl Med* 2010 Dec 8; 2(61): 61ra91.

Lo YM, Chiu RW. *Noninvasive approaches to prenatal diagnosis of hemoglobinopathies using fetal DNA in maternal plasma. Hematol Oncol Clin North Am* 2010 Dec; 24(6):1179-86.

Lo YM, Chiu RW. *Noninvasive approaches to prenatal diagnosis of hemoglobinopathies using fetal DNA in maternal plasma. Hematol Oncol Clin North Am* 2010 Dec; 24(6):1179-86.

Lo YM. *Fetal nucleic acids in maternal blood: the promises. Clin Chem Lab Med* 2011 Oct 25.

Loken, MR., Shah VO, Dattilio KL, and Civin CI. *Flow cytometric analysis of human bone marrow: I Normal erythroid development. Blood* 1987; 69:255-263.

Lugus JJ, Park C, Ma YD, Choi K. *Both primitive and definitive blood cells are derived from Flk-1+ mesoderm. Blood* 2009; 113:563-566.

Lun FM, Chiu RW, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Lo YM. *Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. Clin Chem* 2008; 54:1664-72.

Lun FM, Tsui NB, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Charoenkwan P, Chow KC, Lo WY, Wanapirak C, Sanguansermsri T, Cantor CR, Chiu RW, Lo YM. *Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma*. Proc Natl Acad Sci USA 2008 Dec 16; 105(50):19920-5.

Mandel P, Metais P. *Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme*. CR Acad Sci Paris 1948; 142:241-243.

Maron JL, Bianchi DW. *Prenatal diagnosis using cell-free nucleic acids in maternal body fluids: a decade of progress*. Am J Med Genet C Semin Med Genet 2007; 145C(1):5-17.

Mavrou, A, Kolialexi A, Zheng YL, Metaxotou C, and Bianchi DW. *Improved specificity of NRBC detection in chorionic villus sample supernatant fluids using anti-zeta and anti-epsilon monoclonal antibodies*. Fetal Diagn Ther 1999; 14:291-295.

Maximow AA. *Untersuchungen uber blut und bindegewebe 1. Die fruhesten entwicklungsstadien der blut- und binde-gewebszellen beim saugtierembryo, bis zum anfang der blutbildung unen leber*. Arch Mikroskop Anat 1909; 73:444-561.

McGrath KE, Kingsley PD, Koniski AD, Porter RL, Bushnell TP, Palis J. *Enucleation of primitive erythroid cells generates a transient population of "pyrenocytes" in the mammalian fetus*. Blood 2008; 111:2409-2417.

Mesker WE, Ouwerkerk-van Velzen MC, Oosterwijk JC, Bernini LF, Golbus MS, Kanhai HH, Van Ommen GJ, Tanke HJ. *Two-colour immunocytochemical staining of gamma (gamma) and epsilon (epsilon) type haemoglobin in fetal red cells*. Prenat Diagn 1998 Nov; 18(11):1131-7.

Parks DR, Herzbenbeg LA. *Fetal cells from maternal blood: their selection and prospects for use in prenatal diagnosis*. Methods Cell Biol 1982; 26:277-295.

Pembrey, M. E., D. J. Weatherall, and J. B. Clegg. *Maternal synthesis of haemoglobin F in pregnancy*. Lancet 1973; 1:1350-1354.

Pereda J, Niimi G. *Embryonic erythropoiesis in human yolk sac: Two*

different compartments for two different processes. Microsc Res Tech 2008; 71:856-862.

Ponnusamy S, Mohammed N, Ho SS, Zhang HM, Chan YH, Ng YW, Su LL, Mahyddin AP, Venkat A, Chan J, Rauff M, Biswas A, Choolani M. *In vivo model to determine fetal-cell enrichment efficiency of novel noninvasive prenatal diagnosis methods. Prenat Diagn* 2008; 28(6): 494-502.

Rijnders RJ, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroede MA, Christianens GC. *Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. Obstet Gynecol* 2001; 98:374-8.

Rosatelli MC, Saba L. *Prenatal diagnosis of β -Thalassemia and Hemoglobinopathies. Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2009; 15;1(1):e2009011.

Samura O, Miharu N, Hyodo M, Honda H, Ohashi Y, Honda N, Hara T, Ohama K. *Cell-free fetal DNA in maternal circulation after amniocentesis. Clin Chem* 2003 Jul; 49(7):1193-5.

Sangiorgi F, Woods CM, Lazarides E. *Vimentin downregulation is an inherent feature of murine erythropoiesis and occurs independently of lineage. Development* 1990; 110:85-96.

Sargent IL, Choo YS, Redman CW. *Isolating and analyzing fetal leukocytes in maternal blood. Ann NY Acad Sci* 1994; 731:147-153.

Sasaki K, Kendall MD. *The morphology of the haemopoietic cell of the yolk sac in mice with particular reference to nucleolar changes. J Anat* 1985; 140:279-295.

Scheffer PG, van der Schoot CE, Page-Christiaens GC, Bossers B, van Erp F, de Haas M. *Reliability of fetal sex determination using maternal plasma. Obstet Gynecol* 2010; 115(1): 117-26.

Schmorl G. *Pathologisch-anatomische untersuchungen uber Publereklampsie.* Leipzig: Vogel, 1893.

Schroder J, Tilikainen A, De la Chapelle A. *Fetal leukocytes in the maternal*

circulation after delivery. I. Cytological aspects. Transplantation 1974; 17:346-354.

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 Dec; 47(12):2164-5.

Sekizawa A, Purwosunu Y, Matsuoka R, Koide K, Okazaki S, Farina A, Saito H, Okai T. *Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood.* J Obstet Gynaecol Res 2007 Dec; 33(6):747-64.

Sehnert AJ, Rhees B, Comstock D, de Feo E, Heilek G, Burke J, Rava RP. *Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood.* Clin Chem 2011 Jul; 57(7):1042-9.

Slunga-Tallberg, A, and Knuutila S. *Can nucleated erythrocytes found in maternal venous blood be used in the noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosome abnormalities?* Eur J Hum Genet 1995; 3:264-270.

Steele CD, Wapner RJ, Smith B, Haynes MK, and Jackson LG. *Prenatal diagnosis using fetal cells isolated from maternal peripheral blood: a review.* Clin Obstet Gynecol 1996; 39:801-813.

Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. *Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients.* Eur J Cancer Clin Oncol 1987 Jun; 23(6):707-12.

Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. *Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients.* Oncology 1989; 46(5):318-22.

Tabor A, Vestergaard CH, Lidegaard Ø . *Fetal loss rate after chorionic villus sampling and amniocentesis. An 11-years national registry study.* Ultrasound Obstet Gynecol 2009; 34:19-24.

Tong YK, Ding C, Chiu RW, Gerovassili A, Chim SS, Leung TY, Leung TN, Lau TK, Nicolaidis KH, Lo YM. *Noninvasive prenatal detection of*

fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: Theoretical and empirical considerations. Clin Chem 2006; 52(12):2194-202.

Tong YK, Jin S, Chiu RW, Ding C, Chan KC, Leung TY, Yu L, Lau TK, Lo YM. *Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach.* Clin Chem 2010 Jan; 56(1):90-8.

Tong YK, Chiu RW, Akolekar R, Leung TY, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM. *Epigenetic-genetic chromosome dosage approach for fetal trisomy 21 detection using an autosomal genetic reference marker.* PLoS One 2010 Dec 20; 5(12):e15244.

Tsui DW, Lam YM, Lee WS, Leung TY, Lau TK, Lau ET, Tang MH, Akolekar R, Nicolaides KH, Chiu RW, Lo YM, Chim SS. *Systematic identification of placental epigenetic signatures for the noninvasive prenatal detection of Edwards syndrome.* PLoS One 2010; 5(11):e15069.

Tsui NB, Kadir RA, Chan KC, Chi C, Mellars G, Tuddenham EG, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. *Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA.* Blood 2011 Mar 31; 117(13):3684-91.

Valerio D, Aiello R, Altieri A, Malato P, Fortunato A, and Canazio A. *Culture of fetal erythroid progenitor cells from maternal blood for noninvasive prenatal genetic diagnosis.* Prenat Diagn 1996; 16:1073-1082.

Van der Schott CE, Hahn S, Chitty LS. *Non-invasive prenatal diagnosis and determination of fetal Rh status.* Semin Fetal Neonatal Med 2008; 13:63-8.

Van Handel B, Prashad SI, Hassanzadeh-Kiabi N, Huang A, Magnusson M, Atanassova B, Chen A, Hamalainen EI, Mikkola HK. *The first trimester placenta is a site for terminal maturation of primitive erythroid cells.* Blood 2010; 116:3321-3330.

Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. *Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer.* Lancet 1969; 1:1119-1122.

Wieacker P, Steinhard J. *The prenatal diagnosis of genetic diseases*. Dtsch Arztebl Int. 2010 Dec; 107(48):857-62.

Wright CF, Burton H. *The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non invasive prenatal diagnosis*. Hum Reprod Update 2009; 15:139-51.

Yoshida H, Kawane K, Koliike M, Mori Y, Uchiyama Y, Nagata S. *Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells*. Nature 2005; 437:754-758.

Van der Schott CE, Hahn S, Chitty LS. *Non-invasive prenatal diagnosis and determination of fetal Rh status*. Semin Fetal Neonatal Med 2008; 13:63-8.

Zheng, Y. L., D. K. Zhen, M. A. DeMaria, S. M. Berry, R. J. Wapner, M. I. Evans, D. Copeland, J. M. Williams, and D. W. Bianchi. *Search for the optimal fetal cell antibody: results of immunophenotyping studies using flow cytometry*. Hum Genet 1997; 100:35-42.