

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 734**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/073** (2010.01)

**C12N 5/0789** (2010.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.04.2012 PCT/SG2012/000130**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12141657**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2012 E 12771413 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2697364**

54 Título: **Un método de identificación, aislamiento y/o cultivo de eritroblastos fetales**

30 Prioridad:

**11.04.2011 US 201161473841 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**25.02.2019**

73 Titular/es:

**NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE  
(100.0%)  
21 Lower Kent Ridge Road  
Singapore 119077, SG**

72 Inventor/es:

**FONG, CHUI YEE;  
BONGSO, ARIFFEEN;  
CHOLANI, MAHESH;  
HUANG, ZHOUWEI;  
KALAMEGAM, GAUTHAMAN y  
PONNUSAMY, SUKUMAR**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 701 734 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Un método de identificación, aislamiento y/o cultivo de eritroblastos fetales

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para identificar, aislar y/o cultivar al menos un eritroblasto fetal. En particular, la invención se refiere a un método para identificar al menos un eritroblasto fetal en una muestra analizando la morfología del eritroblasto fetal, aislando el eritroblasto fetal y/o cultivando el eritroblasto fetal en al menos un medio optimizado.

**Antecedentes de la invención**

El diagnóstico prenatal proporciona información valiosa sobre la salud del bebé nonato y puede incluir métodos invasivos y no invasivos. Steele y Nerg realizaron el primer diagnóstico genético seguro por amniocentesis en 1996. Más tarde, se demostró que la toma de muestras de vellosidades coriónicas (MVC) durante el primer trimestre era un enfoque seguro y fiable para el diagnóstico prenatal más precoz. Aunque ambas son técnicas invasivas y albergan riesgos potenciales de aborto espontáneo, siguen considerándose como el criterio de referencia para el diagnóstico prenatal. Siendo así, lentamente se van reemplazando por métodos de diagnóstico prenatal no invasivos (DPNI) en donde se utilizan las células fetales/material genético obtenido de la circulación materna para el diagnóstico prenatal. En particular, la identificación de ADN desprovisto de células, ARNm y las células fetales en la circulación materna permitieron la posibilidad de un DPNI para diagnosticar anomalías cromosómicas y defectos de un solo gen del feto. Sin embargo, los materiales genéticos fetales obtenidos de la circulación materna son más bien insuficientes para proporcionar información fiable sobre las anomalías cromosómicas. En particular, el ADN desprovisto de células en la circulación materna es más bien insuficiente para proporcionar información cromosómica completa, como las aneuploidías para el diagnóstico y, además, es caro. Por otra parte, las células fetales son candidatos prometedores para detectar anomalías cromosómicas, pero su número de células es muy bajo. En particular, la utilización de células fetales que circulan en la sangre materna es prometedora tanto para la detección de aneuploidías, como para proporcionar información genética completa del feto. También en este caso, las principales limitaciones son su escasez en la circulación materna y la falta de técnicas de separación eficientes. Por otra parte, es posible que algunas de estas células persistan de un embarazo anterior y no sean indicativas del estado fetal actual.

Se sabe perfectamente que el diagnóstico prenatal permite la identificación precoz de defectos congénitos del nacimiento y otros factores de riesgo que impiden la supervivencia fetal, lo cual a su vez ayuda a la intervención precoz evitando así complicaciones y aliviando la ansiedad de los padres. De los varios métodos que están disponibles en la actualidad, un diagnóstico de eritroblastos fetales primitivos humanos aislados (EFPh) en la circulación materna sería la estrategia más fiable y no invasiva. Esto se debe a que los EFPh tienen marcadores de identificación únicos y su presencia es definitivamente indicativa del embarazo en curso y, por lo tanto, se considera un posible candidato para el DPNI del principio del primer trimestre.

En la patente internacional 2008/017871, se describe un método para identificar y separar eritroblastos fetales de la sangre materna. Dicho método implica la selección positiva con el empleo de anticuerpos dirigidos a marcadores como HSP-60. Cha et al. 2003, proporciona un método de identificación de eritroblastos fetales definitivos, en el que se fijan las células identificadas y no se pueden cultivar. Choolani et al. 2003 divulga una investigación indagando criterios que se pueden utilizar para identificar eritroblastos fetales primitivos para DPNI. Troeger et al., (1999) divulga un método para enriquecer eritroblastos fetales utilizando anti-GPA y otros criterios de identificación. En Huang et al, 2011, se proporciona una revisión de métodos conocidos.

Sin embargo, con la rutina es posible toparse con ciertos impedimentos y problemas que deben abordarse para facilitar el futuro DPNI, y son: (1) el número de EFPh circulantes en la circulación materna es muy escaso y resulta técnicamente difícil aislar estas células, (2) incluso aunque se consiga aislarlas, estas células pueden no sobrevivir durante mucho tiempo en el medio de transporte y pueden degenerarse en un corto periodo de tiempo, lo cual limita aún más la posibilidad de identificar sistemáticamente defectos congénitos y (3) los EFPh tienen núcleos fuertemente condensados y es difícil estimular a estas células para prolongar su vida mediante el cultivo *in vitro* o para que proliferen para obtener un número adecuado de células para el futuro DPNI.

En vista de la escasez de eritroblastos fetales, hasta la fecha, ningún método ha logrado identificar y/o aislar eritroblastos fetales. Los estudios sobre eritroblastos fetales se han basado únicamente en el cultivo heterogéneo de células, que es posible que no proporcionen información precisa en vista de las células maternas u otras impurezas. La escasa viabilidad *in vitro* de los eritroblastos fetales también limita gravemente la posibilidad de realizar posteriores análisis o estudios en estas células.

Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de un método para detectar, aislar y/o cultivar eritroblastos fetales obtenidos por medios invasivos o no invasivos que mitiguen al menos uno de los problemas mencionados anteriormente y proporcione métodos como posibles enfoques fiables para futuros DPNI utilizando células fetales

presentes en la sangre materna.

### Sumario de la invención

5 La presente invención se define en las reivindicaciones independientes adjuntas. Algunas características opcionales de la presente invención se definen en las reivindicaciones dependientes adjuntas.

10 La presente invención se refiere a un método para identificar eritroblastos fetales en una muestra que comprende determinar la forma y/o estructura de al menos una célula en la muestra que comprende al menos un eritroblasto fetal, en el que puede identificarse la célula que se está determinando como un eritroblasto primitivo humano fetal siempre y cuando comprenda un núcleo, sea CD45 negativo y/o comprenda una relación núcleo-citoplásmica relativamente alta. El eritroblasto fetal puede obtenerse por medios invasivos o no invasivos.

15 De acuerdo con un primer aspecto, se proporciona un método de identificación de al menos un eritroblasto fetal primitivo humano en una muestra, consistiendo el método en:

- (i) proporcionar al menos una célula CD45 negativa nucleada a partir de la muestra; y
- (ii) analizar la morfología de dicha al menos una célula CD45 negativa nucleada por tinción del núcleo y determinar la relación entre el citoplasma y el núcleo, según el área, de dicha al menos una célula con el núcleo teñido de la muestra, en donde si la al menos una célula CD45 negativa tiene una relación entre el citoplasma y el núcleo, según el área, en el intervalo de 16:1 a 9:1 y al menos una de las características seleccionadas entre
  - a. tener un diámetro de célula dentro del intervalo de 10-20  $\mu\text{m}$ ;
  - b. no ser adherente dentro de una superficie celular no pegajosa lisa;
  - c. ser maleable; y/o
  - d. ser de forma globular,

20 la al menos una célula CD45 negativa se identifica como un eritroblasto fetal primitivo humano, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre materna, sangre del cordón umbilical, líquido amniótico, muestra de vellosidades coriónicas, sangre fetal y tejido fetal, y en donde el eritroblasto fetal primitivo humano identificado se puede cultivar.

25 De acuerdo con un segundo aspecto, se proporciona un método para cultivar al menos un eritroblasto fetal primitivo humano a partir de una muestra, comprendiendo dicho método:

- (i) identificar al menos un eritroblasto fetal primitivo humano de acuerdo con el primer aspecto;
- (ii) aislar el al menos un eritroblasto fetal humano identificado en (i) utilizando un micromanipulador;
- (iii) cultivar el al menos un eritroblasto fetal humano aislado en (ii) en un medio que comprende IMDM (medio de Dulbecco modificado con Iscove), 30 % de FBS (suero bovino fetal), 1 % de BSA (albúmina de suero bovino,  $10^{-4}$  moles/l  $\beta$ -mercaptoetanol, 100  $\mu\text{g/ml}$  de transferrina saturada con hierro).

30 Puede utilizarse un método de aislamiento de al menos un eritroblasto fetal desde una muestra, comprendiendo dicho método, identificar el eritroblasto fetal de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invención y aislar el eritroblasto utilizando medios con capacidad para aislar el eritroblasto fetal individualmente.

35 El método de cultivo de al menos un eritroblasto fetal primitivo humano puede comprender el cultivo del eritroblasto en un medio que comprende al menos un mitógeno y/o al menos un factor epigenético.

40 Tal como se podrá apreciar a partir de la siguiente descripción, las realizaciones específicas de la presente invención permiten la identificación, el aislamiento y el cultivo de eritroblastos fetales.

45 La presente invención también proporciona un método para diagnosticar al menos un trastorno prenatal en un feto, comprendiendo dicho método:

- i. cultivar al menos un eritroblasto fetal primitivo de acuerdo con el segundo aspecto;
- ii. determinar al menos un marcador genético asociado con el trastorno prenatal en el eritroblasto fetal; en donde el método es *in vitro*.

50 Puede utilizarse un medio para el cultivo de eritroblastos fetales. Puede obtenerse al menos un eritroblasto fetal aislado aplicando el método de acuerdo con cualquiera de los aspectos de la presente invención. Tanto ésta como otras ventajas relacionadas se pondrán de manifiesto para las personas expertas en la materia con la descripción expuesta a continuación.

**Breve descripción de las figuras**

A continuación, se describen realizaciones específicas de una tira reactiva de la presente invención mediante ejemplos haciendo referencia a las figuras adjuntas en las que:

5 La Figura 1 es un diagrama esquemático de la micromanipulación y el cultivo en microgotas de eritroblastos fetales primitivos humanos (EFPh).

10 La Figura 2 es una representación esquemática de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) que pueden generarse a partir de eritroblastos fetales primitivos (EFp) utilizando genes pluripotentes y moléculas pequeñas. VPA: ácido valproico; TSA: tricostatina A; 5-aza: 5-azacitidina.

15 La Figura 3 es un gráfico de la viabilidad de las células EFPh en cultivo de microgotas normóxicas e hipóxicas a lo largo del tiempo. La barra de error representa errores típicos. \* p <0,01.

La Figura 4 es un gráfico de la viabilidad de EFPh en condiciones de cultivo de microgotas normóxicas con mitógeno de Pokeweed hasta 48 horas. La barra de error representa errores típicos. La unidad de concentración Pokeweed (PW) es µg/ml.

20 La Figura 5 son imágenes de inmunocitoquímica de EFPh con anticuerpos H3 anti-acetilados y anticuerpos H3 anti-trimetilados. Barra de escala es 5 µm.

25 La Figura 6 es un gráfico de barras de las expresiones de la beta-globina humana (HBB) y de la región Y determinante del sexo (SRY) según se detectan por PCR cuantitativa en 10 EFPh después de la amplificación del genoma completo. EP1 = tricostatina A, EP2 = 5-azacitidina. Se utilizó ADN trofoblástico como control positivo.

**Descripción detallada de las realizaciones preferentes**

30 Las referencias bibliográficas mencionadas en la presente memoria descriptiva se enumeran para mayor facilidad en forma de lista de referencias al final de los ejemplos. La referencia a un elemento con el artículo indefinido "un", "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos, a no ser que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una", tal como se emplea en el presente documento significa por tanto normalmente "al menos uno".

35 La expresión "que comprende" y sus conjugaciones se utiliza en su sentido no exhaustivo para indicar que se incluyen los artículos que siguen a la palabra, pero no se excluyen los artículos que no se mencionan específicamente. Por consiguiente, la expresión "que comprende" abarca las expresiones más restrictivas "que consiste esencialmente en" y "que consiste en".

40 El término "CD45 negativo", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a cualquier célula que no expresa señal o que es negativa para las formas nativas, recombinantes o sintéticas de la molécula/marcador CD45. La presencia de expresión de CD45 en una célula en una muestra puede determinarse aplicando cualquier método de inmunotinción conocido en la técnica y utilizando cualquier reactivo anti-CD45. Cualquier célula teñida positivamente con reactivo anti-CD45 puede ser excluida ya que pueden incluir glóbulos blancos CD45positivos.

45 La expresión "relación núcleo-citoplásmica" (C/N; relación C: N), que se puede utilizar indistintamente con la frase "relación entre citoplasma y núcleo de una célula" o "relación citoplasma a núcleo", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a una comparación del área del citoplasma y el área de los núcleos presentes en el citoplasma aplicando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar una imagen de reacción de radiación UV para obtener esta medida. El área del citoplasma puede comprender o no áreas de pocillos celulares o estructuras celulares internas como vacuolas, mitocondriales, etc. El área de los núcleos puede comprender o no distritos de membrana nuclear. En caso de que esté presente más de un núcleo en una célula, puede determinarse el área de un núcleo o puede determinarse el área de todos los núcleos presentes. La relación núcleo-citoplásmica de la célula puede determinarse para cada célula individualmente o para una agrupación o subagrupación de células presentes en un área definida de la imagen, p.ej., un área que comprende aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000, 35000, 38000, 40000, 43000, 45000, 50000, 60000 o 70000 µm<sup>2</sup>. En otro ejemplo, la relación de la región se puede realizar calculando el área de la superficie y/o el volumen tanto del citoplasma como del núcleo por separado. Se puede considerar que una célula tiene una relación entre citoplasma y núcleo relativamente alta siempre que el área del citoplasma sea ligeramente mayor que el área del núcleo en una célula. Por ejemplo, siempre que el citoplasma sea al menos 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 % más grande que el núcleo, se puede considerar que la célula tiene una relación entre citoplasma y núcleo relativamente alta. En ejemplos específicos, el término "alto" se refiere a un área de citoplasma que es detectablemente más alta (mayor) que el núcleo. La relación núcleo-citoplásmica oscilará entre 16:1 y 9:1, o cualquiera de los enteros en los intervalos. En particular, la relación C: N de un eritroblasto fetal puede ser 10:1 o similar.

- 5 El término "eritroblasto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un glóbulo rojo que tiene un núcleo. En particular, un eritroblasto se refiere a una célula precursora nucleada a partir de la cual se desarrolla un reticulocito en un eritrocito. El "eritroblasto" se puede utilizar indistintamente con un "normoblasto" y se refiere a un glóbulo rojo nucleado, el precursor inmediato de un eritrocito. Por ejemplo, el eritroblasto puede ser de origen mamífero. En particular, el eritroblasto puede ser un eritroblasto fetal primitivo o humano. Los "eritrocitos" o "glóbulos rojos" o "RBC" incluyen glóbulos rojos fetales y adultos no nucleados.
- 10 El término "globular", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a una célula que tiene forma esférica (forma de globo) en oposición a una célula que tiene forma bicóncava.
- 15 El término "factor de crecimiento", como se emplea en el presente documento, se refiere a al menos una proteína que hace que las células en reposo experimenten división celular y, en algunos casos, diferenciación. Los factores de crecimiento pueden ser específicos del tipo de célula, que estimulan la división únicamente de las células con receptores apropiados; o más general en sus efectos. Los factores de crecimiento pueden incluir, pero sin limitarse a ellos, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), eritropoyetina, factor de células madre (SCF), factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF) y una familia de proteínas llamadas linfoquinas, que incluye interleucinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, etc.), interferón y similares.
- 20 La expresión "aumentar la viabilidad", tal como se emplea en el presente documento se refiere al acto de aumentar la supervivencia de una célula. Esto puede incluir el aumento del periodo de supervivencia de la célula donde sigue siendo capaz de mantener su función. Por ejemplo, el método de cultivo que se proporciona en la presente invención puede potenciar o mejorar la supervivencia de una célula a más de 24 horas *in vitro*. Por ejemplo, el eritroblasto fetal puede ser viable durante al menos 48 horas, 56 horas, 72 horas, 1 semana, 2 semanas y similares, dependiendo del organismo en cuestión. Por ejemplo, la viabilidad celular puede medirse por recuento de células, es decir, recuento del número de células viables y células muertas en cada momento. Las células viables tienen una membrana plasmática clara y diferenciada por microscopía de contraste de fase, mientras que las células no viables tienen membranas disgregadas que hacen que el núcleo sea más evidente.
- 25 El término "individualmente", tal como se emplea en el presente documento se refiere a una célula la vez. Por ejemplo, en el método de aislamiento de la presente invención, puede seleccionarse cada eritroblasto fetal identificado uno cada vez para cultivar la célula. Un ejemplo no exhaustivo de un medio para seleccionar una célula individualmente es un micromanipulador.
- 30 El término "maleabilidad", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a la capacidad de extenderse o remodelarse por influencia externa. Por ejemplo, las células que son maleables pueden ser flexibles, moldeables y/o flexibles durante la aspiración en una micropipeta. Un eritroblasto fetal aislado puede considerarse maleable.
- 35 El término "mamífero" se define en el presente documento como un individuo mamífero, en particular, un primate, por ejemplo, un ser humano. Para propósitos de investigación, el sujeto puede ser un ser no humano.
- 40 Por ejemplo, el sujeto puede ser un animal adecuado para uso en un modelo animal, p.ej., un cerdo, un caballo, un ratón, una rata, una vaca, un perro, un gato, ganado, primates no humanos (por ejemplo, chimpancé) y similares.
- 45 El término "microgota", tal como se emplea en el presente documento se refiere a aproximadamente 5 a aproximadamente 20  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo. En particular, la microgota puede ser 6, 7, 8, 10, 14, 15, 18 o 19  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo.
- 50 El término "mitógeno", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia química que promueve la división y/o transformación celular. Entre los ejemplos no exhaustivos de mitógenos se pueden incluir concanavalina A, fitohemaglutinina, lipopolisacárido (LPS), factores de crecimiento de tipo insulina (IGF), mitógeno de pokeweed y similares.
- 55 La expresión "morfología de una célula", tal como se emplea en el presente documento, se refiere en general a la forma, estructura y configuración de una célula y puede incluir aspectos de la apariencia de la célula como la forma, el color o el patrón de la parte interna o externa de una célula. La morfología de una célula también puede incluir la nucleación de una célula, que la célula esté nucleada o no nucleada, que la célula sea CD45 negativa o positiva y/o la relación núcleo-citoplásmica de la célula. Otros aspectos que pueden entrar dentro de la definición de morfología de una célula incluyen el tamaño de la célula, por ejemplo, el diámetro de la célula, la capacidad de adherencia de la célula, por ejemplo, si la célula se adhiere o no a una superficie, la maleabilidad de una célula y similares. La expresión "forma de una célula" puede utilizarse indistintamente con la expresión "configuración de una célula" y, tal como se emplea en el presente documento, se refiere a las formas de la célula típicas, como células circulares, células elípticas, células tipo shmoo, formas de división de tipo mancuerna, formas de célula de tipo estrella, células planas, células de tipo escala, células de columna, células invaginadas, células con paredes cóncavas, células con paredes convexas, la presencia de prolongaciones, apéndices y cilios, la presencia de ángulos o esquinas, etc., Las morfologías y configuraciones típicas son conocidas entre las personas expertas en la materia y se pueden derivar
- 60
- 65

de ellas.

5 El término "nucleado" tal como se emplea en el presente documento se refiere a una célula que tiene un núcleo. Las células nucleadas pueden distinguirse de los glóbulos rojos que no están nucleados sobre la base de cualquiera de las tinciones nucleares conocidas en la técnica.

La expresión "falta de adherencia", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a una célula que requiere poco o ningún soporte, anclaje y/o unión a una superficie para permanecer viable *in vitro*.

10 El término "superficie celular no pegajosa", tal como se emplea en este documento, se refiere a células que no se adhieren entre sí a diferencia de los glóbulos rojos que tienden a formar "Rouleaux" (pilas de monedas). Las personas expertas en la materia entenderán a que se refiere el término "formación de rouleaux" en relación con RBC.

15 La expresión "condición normóxica", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un entorno con un nivel de oxígeno normal *in vivo* o *in vitro*. El estado normal de oxígeno *in vitro* puede ser aproximadamente al menos 21 % de oxígeno. La frase "condición normóxica" se utiliza como antónimo de "condición hipóxica", que se refiere al entorno con un nivel de oxígeno reducido o empobrecido *in vivo* o *in vitro*. El estado de oxígeno hipóxico *in vitro* puede ser 5 % de oxígeno.

20 El término "recubierto", tal como se emplea en el presente documento en combinación con el término "aceite mineral" que se refiere a proporcionar una capa de aceite mineral encima o sobre el medio de cultivo.

25 El término "trastorno prenatal", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a enfermedades o afecciones en un feto o un embrión antes de que nazca. El trastorno prenatal puede seleccionarse del grupo no exhaustivo que consiste en síndrome de Down, síndrome de Edwards, síndrome de Patau, un defecto del tubo neural, espina bífida, paladar hendido, enfermedad de Tay Sachs, anemia de células falciformes, talasemia, fibrosis quística, síndrome de X frágil, atrofia muscular espinal, distrofia miotónica, enfermedad de Huntington, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, hemofilia, distrofia muscular de Duchenne, trastorno mitocondrial, exostosis múltiple hereditaria, trastorno de osteogénesis imperfecta y similares.

35 El término "muestra", tal como se emplea en el presente documento se refiere a un subconjunto de tejidos, células o partes componentes (por ejemplo, fluidos) que pueden incluir, pero sin limitarse a ellos, tejido materno, sangre materna, sangre del cordón umbilical, amniocentesis, muestra de vellosidades coriónicas, sangre fetal y/o tejido/fluidos fetales. En particular, el tejido fetal puede ser tejido trofoblástico, tejido de la placenta o una combinación de ellos. La muestra, tal como se emplea en la presente invención puede haber sido sometida previamente a una purificación de gradiente de densidad incluyendo, pero sin limitarse a ellos, gradiente de Ficoll y gradiente de Percoll.

#### 40 **Diagnóstico prenatal invasivo/medios prenatales invasivos**

##### **- Amniocentesis**

45 El análisis de cromosomas en el líquido amniótico aspirado en el segundo trimestre del embarazo (amniocentesis) fue realizado por primera vez hace más de cuatro décadas (Kubli y Hindermann 1966). Hoy en día, es el método utilizado convencionalmente a las 16 a 18 semanas de embarazo con un bajo riesgo para el feto después de la extracción de aproximadamente 10 a 20 ml de líquido. Después del procedimiento de aspiración se separan las células en el líquido amniótico y se cultivan *in vitro* en medios de cultivo especialmente diseñados para amplificar el número de células para un diagnóstico posterior. Se pueden recoger aproximadamente de 2 a 3 x 10<sup>5</sup> células (Weise et al., 1984) de 10 ml de líquido amniótico y los orígenes de estas células son del revestimiento interno de la membrana amniótica, la piel, el tracto respiratorio y urogenital del feto, como resultado del desprendimiento, la micción y o los movimientos físicos del feto dentro del saco amniótico. La amniocentesis se ha utilizado de forma rutinaria para detectar anomalías cromosómicas como los síndromes de Down, Edward y Patau, defectos del tubo neural y otros trastornos genéticos. Aunque la amniocentesis es una herramienta de rutina para el diagnóstico prenatal en muchos hospitales, existen riesgos de aborto espontáneo al ser un método invasivo. Se ha notificado que la tasa de abortos espontáneos relacionados con la amniocentesis es aproximadamente del 1 % (Tabor et al., 2009).

##### **- Muestreo de vellosidades coriónicas (MVC)**

60 El muestreo de vellosidades coriónicas (MVC) como herramienta para el diagnóstico prenatal se desarrolló por primera vez en 1984 (Kuliev et al 1993). En este procedimiento, se aspiran por vía transcervical o transabdominal las muestras de vellosidades coriónicas y se utilizan las células fetales dentro del tejido para el diagnóstico. La ventaja de la MVC con respecto a la amniocentesis es que puede realizarse en una fase del embarazo más temprana (generalmente antes de las 14 semanas de gestación) proporcionando un diagnóstico precoz y aliviando así la ansiedad a los padres. Se ha utilizado MVC para la detección de anomalías cromosómicas similares a las de la

amniocentesis. En el método MVC también existen riesgos de aborto espontáneo en la región de aproximadamente un 2 % (Tabor et al., 2009).

**- Muestreo de sangre fetal**

5 El muestreo de sangre fetal, también conocido como muestreo percutáneo de sangre del cordón umbilical es un procedimiento para extraer una pequeña cantidad de sangre del cordón umbilical del feto. La muestra de sangre fetal se puede utilizar para detectar anomalías cromosómicas, trastornos sanguíneos y metabólicos e infecciones, y resulta útil cuando no es posible obtener información a través de amniocentesis y MVC. La extracción de muestras de sangre del feto se realiza habitualmente al final de la gestación después de 17 semanas y tiene una tasa alta de abortos espontáneos del 2-3 % (Buscaglia et al., 1996; Antsaklis et al., 1998).

**Diagnóstico prenatal no invasivo (DPNI)/medios prenatales no invasivos**

**- Ecografía**

15 La ecografía es un procedimiento común no invasivo que se realiza de forma rutinaria en la atención prenatal. Ayuda a visualizar el feto en el útero y proporciona información sobre su estado de crecimiento. Con el uso de la ecografía es posible detectar anomalías importantes del desarrollo, como el síndrome de Down, evaluando el grosor del pliegue nucal y su translucencia, así como los órganos fetales. Aunque la ecografía es muy útil para llevar un seguimiento del crecimiento fetal y detectar los fenotipos de las anomalías del desarrollo, sus tasas de falsos positivos son altas. Por ejemplo, en la prueba de grosor de translucencia nucal, aproximadamente 5 % de los fetos positivos no tienen en realidad síndrome de Down (Muller et al., 2003). La mayoría de los defectos fetales son causados por una composición genética anormal (número y morfología de cromosomas, defectos genéticos), siendo así, muchos de ellos no pueden detectarse a través de una ecografía.

**- Detección de suero materno ("Prueba triple")**

30 La detección de suero materno, también denominada "prueba triple", es un análisis de sangre que ayuda a determinar el riesgo de ciertas anomalías cromosómicas, como el síndrome de Down y los defectos del tubo neural. Normalmente se realiza en el primer o segundo trimestre del embarazo midiendo una combinación de niveles en suero de alfa-fetoproteína, estriol y gonadotropina coriónica humana. Un análisis positivo indica un alto riesgo de un trastorno en particular, pero el diagnóstico no es definitivo. Si el resultado es positivo, debe confirmarse el diagnóstico posteriormente con otros procedimientos invasivos, como la amniocentesis o el MVC.

**- Diagnóstico genético preimplantacional (DGP) en la fertilización *in vitro* (FIV)**

40 El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) es una prueba de diagnóstico prenatal especial para pacientes que se someten a la fertilización *in vitro* (FIV). En pacientes de FIV de mayor edad (> 40 años) con posibles aneuploidias debidas a defectos de los óvulos relacionados con la edad y en pacientes de FIV con abortos espontáneos habituales después de la transferencia de embriones debido a posibles translocaciones desequilibradas, la DGP en biopsias de embriones ha pasado a ser una herramienta de diagnóstico de rutina. DGP también está disponible para muchos trastornos monogénicos, como la fibrosis quística y la beta-talasemia y algunas anomalías cromosómicas. La principal ventaja de este método es que puede evitar la interrupción selectiva del embarazo porque solo se transfieren embriones genéticamente normales, pero su desventaja es que está reservado solo para pacientes de FIV.

**- ADN y ARNm fetal desprovisto de células en sangre materna**

50 Lo et al. notificaron por primera vez grandes cantidades de ADN fetal desprovisto de células en plasma y suero maternos en 1997 y tres años más tarde, también se observó ARNm fetal desprovisto de células en el plasma materno (Poon et al., 2000). El ADN fetal desprovisto de células lleva información genética valiosa del feto y se ha demostrado que es adecuado para diagnosticar el sexo del feto, el tipo de sangre rhesus D (RhD) fetal y algunos trastornos de un solo gen, como beta-talasemia y acondroplasia (ACH) (Saito et al., 2000; Chiu et al., 2002; Vrettou et al., 2003; Li, et al., 2005). Sin embargo, debido a las reducidas cantidades de ADN fetal desprovisto de células en el ADN libre total en el plasma materno, la cuantificación de loci fetales específicos a partir del material fetal desprovisto de células es difícil e ineficaz. Este problema se resolvió mediante el uso de ARNm fetal que es específico para el tejido de la placenta y minimiza la contaminación materna de fondo. Sin embargo, en el uso de ADN fetal o ARNm desprovisto de células, el diagnóstico de aneuploidía fetal sigue siendo la principal dificultad para el DPNI. Se ha demostrado que la secuenciación escopeta de ADN fetal desprovisto de células proporciona un diagnóstico preciso de la aneuploidía fetal (Fan et al., 2008). En un estudio más reciente, todo el perfil genético del feto podría revelarse mediante la secuenciación del ADN desprovisto de células fetales en la sangre materna (Lo et al., 2010). El mismo grupo realizó un estudio a mayor escala en muestras de plasma materno utilizando un análisis de secuenciación de ADN multiplexado y demostró que era capaz de descartar la trisomía fetal 21 en embarazos de alto riesgo, evitando así procedimientos de diagnóstico invasivos (Chiu RW et al., 2011). Sin embargo, antes de que se puedan utilizar estas técnicas recién desarrolladas para aplicaciones clínicas de rutina, es necesario realizar

ensayos en un mayor número de muestras para optimizar los protocolos y ha de considerarse su rentabilidad.

**- Células fetales en la sangre materna**

5 La presencia de células fetales en la circulación materna fue documentada por primera vez en 1893, cuando se  
 encontraron trofoblastos sincitiales multinucleados en el tejido pulmonar de mujeres embarazadas fallecidas por  
 eclampsia (Schmorl, 1893). Esta importante observación sentó las bases para el uso de células fetales en la sangre  
 materna para el diagnóstico prenatal no invasivo. Las células fetales intactas, en comparación con el ADN y el  
 10 ARNm fetales desprovistos de células, tienen la ventaja de retener información genética fetal completa en el núcleo  
 y el citoplasma que puede proporcionar información en el diagnóstico genético complejo. Existen diversos tipos de  
 células fetales presentes en la sangre materna, es decir, trofoblastos, linfocitos, eritroblastos y células madre  
 hematopoyéticas. El tráfico de células trofoblásticas no suele tener lugar durante el embarazo y su enriquecimiento  
 desde la sangre materna es difícil debido a la falta de fabricantes específicos. Por otra parte, debido al mosaicismo  
 15 placentario, el cariotipo de aproximadamente el 1 % de las células placentarias es diferente del cariotipo real del feto  
 (Henderson et al., 1996; Goldberg y Wohlferd, 1997), lo cual lleva a un diagnóstico genético falso positivo y falso  
 negativo. Por lo tanto, el uso de trofoblastos en sangre materna para DPNI está limitado. Se ha demostrado  
 anteriormente que los linfocitos fetales presentes en la sangre materna son útiles para la determinación del sexo del  
 feto (Walknowska et al., 1969; Schroer y De la Chapelle, 1972; Grosset et al., 1974) por su capacidad para proliferar  
 20 *in vitro*. Sin embargo, su desventaja, tal como se demostró, es que podían persistir en la sangre materna durante un  
 período de tiempo muy largo, incluso después de 27 años después del parto (Bianchi et al., 1996), lo cual lleva a un  
 diagnóstico erróneo del embarazo actual. Por tanto, es preferente un tipo de célula con una vida corta y, siendo así,  
 los eritroblastos fetales (EF) o los glóbulos rojos nucleados son buenos candidatos para un DPNI ya que se pueden  
 detectar al principio del embarazo, tienen una vida corta y se pueden desarrollar anticuerpos específicos para su  
 25 enriquecimiento desde la sangre materna. Sin embargo, existen grandes desafíos en el uso de EF ya que el número  
 de EF en la sangre materna es reducido y se estima en 1 por cada  $10^5$  a 1 por cada  $10^9$  células mononucleares  
 (Ganshirt-Ahiert et al., 1990; Price et al., 1991). Como promedio, se obtienen aproximadamente 20 EF después del  
 enriquecimiento de 20 ml de sangre materna (Busch et al., 1994). La pureza final de los EF es baja, incluso cuando  
 se usan anticuerpos específicos para clasificarlos desde la sangre materna. Hay quien ha cultivado progenitores  
 eritroides fetales de la sangre materna con capacidad de proliferación con la esperanza de que se pudiera obtener  
 30 un mayor número de células fetales para el diagnóstico prenatal. Sin embargo, dada la contaminación de las células  
 maternas en el cultivo, la amplificación selectiva de progenitores fetales con respecto a los maternos no tuvo éxito en  
 estos estudios (Lo et al., 1994; Bohmer et al., 2001; Campagnoli et al., 2002). Se topó con problemas similares  
 cuando se cultivaron células madre hematopoyéticas CD34 + de sangre materna para el diagnóstico prenatal. Las  
 células CD34+ tanto fetales como las maternas proliferaron en el cultivo, dificultando la separación de las dos  
 35 poblaciones y el diagnóstico de las células fetales. También se ha observado que las células madre fetales CD34+  
 persisten después del parto en la sangre materna. Además del problema del número de células y el enriquecimiento  
 y la expansión *in vitro* de células fetales en la sangre materna, el análisis por PCR de estas células suele estar  
 asociado a un alto nivel de descenso de alelos como resultado de la no amplificación de uno de los dos alelos. Esto  
 requeriría el análisis de al menos cinco a seis células fetales para compensar la tasa de descenso (Hahn et al.,  
 40 2008). T

Los métodos de enriquecimiento de los EF de la sangre materna incluyen separación de células activadas por  
 fluorescencia (FACS), separación de células activadas magnéticamente (MACS), centrifugación de gradiente de  
 45 densidad, separación de flujo cargado, lisis selectiva de eritrocitos y métodos a base de lectina. FACS y MACS se  
 basan en el reconocimiento de antígeno-anticuerpo utilizando anticuerpos específicos para las células fetales  
 diana. El primer anticuerpo monoclonal utilizado para enriquecer el eritroblasto fetal fue CD71 (Bianchi et al., 1990)  
 pero la pureza de los EF después de la clasificación siguió siendo baja. La pureza se mejoró posteriormente  
 utilizando el empobrecimiento de MACS de anti-CD45 antes de la selección positiva de células CD71 positivas  
 (Busch et al., 1994). Para evaluar el potencial de los EF para el DPNI, se realizó un estudio multicéntrico a gran  
 50 escala, conocido como NIFTY, entre 1995 y 1999 (Bianchi et al., 2002). Los resultados de este estudio demostraron  
 que la separación de MACS produjo una mejor recuperación de EF en comparación con la separación de FACS. Sin  
 embargo, en ambos métodos, los EF fueron difíciles de detectar, probablemente debido al escaso número de estas  
 células en la sangre materna. Este estudio concluyó que el método de separación basado en las interacciones entre  
 el antígeno específico de la célula y los anticuerpos correspondientes tiene sus limitaciones. Para eliminar los  
 55 eritrocitos maduros de la sangre materna, se desarrollaron sistemas de gradiente de densidad selectiva para  
 enriquecer células mononucleares. Se probaron diversos gradientes de densidad con Percoll y Ficoll para separar  
 EF del resto de las células en la sangre materna, pero las tasas de recuperación siguieron siendo muy bajas  
 (Troeger et al., 1999; Samura et al., 2000; Prieto et al., 2001; Voullaire et al., 2001). Sigue pendiente de desarrollo el  
 protocolo de enriquecimiento ideal para los EF de la sangre materna con altas tasas de recuperación y pureza.

**- Eritroblastos fetales primitivos**

Se han notificado dos tipos distintos de eritropoyesis durante el desarrollo embrionario de los mamíferos: (1)  
 eritropoyesis primitiva en el saco vitelino y (2) eritropoyesis definitiva principalmente en el hígado fetal y la médula  
 65 ósea. Mientras que la eritropoyesis definitiva está muy estudiada en adultos, la eritropoyesis primitiva se entiende  
 peor dada su presencia transitoria en el feto precoz. Se reconoció enseguida que las células eritroides primitivas

aparecen en las islas de sangre del saco vitelino (Maximow et al., 1909) y que la eritropoyesis primitiva era el primer proceso de desarrollo que producía eritrocitos para suministrar oxígeno para la supervivencia y el crecimiento del feto. Un estudio demostró que los eritroblastos primitivos humanos eran los únicos glóbulos rojos circulantes presentes en el feto y su saco vitelino hasta la semana 6 (Pereda y Niimi, 2008). Algunos estudios han señalado sin embargo que la eritropoyesis primitiva surge de precursores hemangioblásticos en la capa mesodérmica de la pared del saco vitelino (Ema et al., 2006; Choi et al., 1998; Lugus et al., 2009).

Los glóbulos rojos primitivos, también llamados eritroblastos primitivos, se distinguen de los glóbulos rojos definitivos por que comienzan a circular en el torrente sanguíneo como células nucleadas y contienen un tipo embrionario de hemoglobina, es decir, épsilon-globina. Durante mucho tiempo estuvo vigente el dogma de que los eritroblastos primitivos comparten muchas características con sus homólogos no mamíferos, como estar nucleados durante toda la vida. Ya existiera o no confusión sobre los enucleado de eritroblastos primitivos desde que se descubrieron, en los últimos años se han estudiado ampliamente en modelos murinos. En el feto de ratón, hubo evidencias para demostrar que los eritroblastos primitivos experimentan enucleación en el hígado fetal (Kingsley et al., 2004; Fraser et al., 2007). Después de la enucleación con eritroblastos se generaron dos poblaciones de células, concretamente, reticulocitos y pirenocitos que son núcleos excluidos rodeados por un borde delgado de citoplasma. Los pirenocitos son eliminados rápidamente por los macrófagos por fagocitosis (Yoshida et al., 2005; McGrath et al., 2008). En el ser humano, debido a las sensibilidades éticas y por razones prácticas, no se han realizado muchos estudios sobre la eritropoyesis primitiva. Van Handel et al (2010) señaló recientemente que la placenta humana era el sitio anatómico para la enucleación de eritroblastos primitivos y que la enucleación probablemente requería la interacción con macrófagos en las vellosidades coriónicas.

#### Propiedades troncales de los EFp

En la médula ósea adulta, las células madre hematopoyéticas (CMH) son capaces de auto renovarse y diferenciarse en todos los linajes sanguíneos. Cuando se decide la ruta de diferenciación específica para las CMH hacia un linaje eritroide, las células progenitoras aguas abajo también son capaces de auto-renovación, pero de una manera más restringida, ya que continúan diferenciándose. En la eritropoyesis definitiva en adultos, los progenitores con restricción eritroide inmaduros, que se denominan unidades formadoras de estallidos eritroides (BFU-E) tienen una mejor capacidad proliferativa que los progenitores eritroides en etapa tardía [unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E)]. Posteriormente, las CFU-E se diferencian en una cascada de precursores eritroides que experimentan de tres a cuatro divisiones celulares a medida que progresan desde los estadios del eritroblasto proeritroblastos a basófilos, policromatófilos y ortocromáticos. Los eritroblastos ortocromáticos finalmente se enuclean para producir reticulocitos que entran en el torrente sanguíneo y se convierten enseguida en eritrocitos. Cabe destacar que recientemente se ha descubierto que un tipo de célula precursora eritroide definitiva derivada de embriones de ratón tempranos (saco vitelino e hígado fetal) tiene un extenso potencial de proliferación *ex vivo*, mucho mejor que sus homólogos adultos (England et al., 2010). En el mismo estudio, se cultivaron también precursores eritroides de la eritropoyesis primitiva, pero se descubrió que no eran proliferativos.

Aunque se ha señalado que la eritropoyesis primitiva se origina a partir de hemangioblastos, el proceso de maduración de las células eritroides primitivas es similar al de la eritropoyesis definitiva, tal como se demuestra en el modelo murino (Palis et al., 2010). La eritropoyesis primitiva humana no está bien estudiada, pero puede compartir muchas características comunes con el modelo de ratón. Sin embargo, aún no está claro si los eritroblastos primitivos humanos experimentan el mismo proceso de diferenciación que los eritroblastos primitivos de ratón que se enuclean en última instancia para formar reticulocitos. El potencial de auto-renovación de los eritroblastos primitivos humanos tampoco se ha explorado, probablemente por motivos éticos y por la dificultad de acceder a dichas células. Dado el hecho de que morfológicamente, los EFp tienen tamaños nucleares y citoplásmicos variados, como las células madre embrionarias humanas (CMEh) y el hecho de que sean células blásticas, sería importante investigar si poseen propiedades troncales. Por lo tanto, puede ser útil investigar la presencia de antígenos marcadores de superficie relacionados con la troncalidad y los perfiles de marcadores CD en los eritroblastos primitivos humanos. Existe toda una batería completa de marcadores característicos para identificar células madre con propiedades de auto-renovación a largo plazo. Dado que los eritroblastos primitivos se originan en el mesodermo de la membrana embrionaria del saco vitelino temprano, deben evaluarse en este tipo de célula los marcadores de células madre embrionarias humanas (CMEh), células madre mesenquimales y células madre hematopoyéticas. Las células madre embrionarias humanas (CMEh) tienen antígenos marcadores de superficie típicos como SSEA3, SSEA4, Tra-1-60 y Tra-1-81 y antígenos nucleares como OCT4, SOX2 y NANOG, LIN28, c-MYC y KLF4, que ayudan a mantener todos ellos la capacidad de auto-renovación y la pluripotencia. El aumento de fosfatasa alcalina y los niveles de telomerasa son también dos marcadores indicativos de la troncalidad de las células embrionarias. Una vez comprobados todos estos marcadores de troncalidad en los eritroblastos primitivos humanos puede ser posible identificar a qué etapa de diferenciación pertenece en el proceso de hematopoyesis primitiva y si se trata de una célula progenitora que puede auto-renovarse y diferenciarse más o si se trata de una célula terminalmente diferenciada ya.

**Morfología del eritroblasto fetal primitivo (EFp)**

El eritroblasto primitivo humano tiene una alta relación núcleo-citoplásmica y tiene un tamaño mayor en comparación con los eritroblastos definitivos y comparte algunas propiedades comunes con los eritroblastos definitivos. Cabe destacar que la alta relación núcleo-citoplásmica es una característica de las células madre embrionarias humanas (Bongso et al 1994). Los eritroblastos primitivos sufren cambios morfológicos en consonancia con la maduración definitiva de los eritroblastos. A medida que maduran los eritroblastos primitivos, se acumulan cantidades crecientes de hemoglobina en su citoplasma (De la Chapelle et al., 1969), merman de tamaño (Henery et al., 1992), sus núcleos se condensan progresivamente (Sasaki et al., 1985) y pierden filamentos intermedios con el núcleo libre para moverse en el citoplasma (Sangiorgi et al., 1990). Un rasgo distintivo de los eritroblastos primitivos es que circulan en la sangre en un estado nucleado, a diferencia de los eritroblastos definitivos que se enuclean antes de entrar en la circulación. Los eritroblastos primitivos aislados de la sangre materna de mujeres embarazadas tienen una morfología ligeramente diferente en comparación con los del feto. Por lo general, poseen núcleos picnóticos que están muy condensados. Esto puede estar provocado por la diferencia en la concentración de oxígeno entre la sangre materna y la fetal (Babochkina et al., 2005).

**EFp para DPNI**

A pesar de las limitaciones del uso de células fetales en sangre materna para el DPNI, continúan los estudios sobre su enriquecimiento, cultivo y eficiencia de PCR. El EF primitivo (EFp) del primer trimestre sigue considerándose un candidato prometedor para el DPNI precoz ya que aparece al principio de la gestación durante el primer trimestre, tiene una semivida corta y puede distinguirse de los eritrocitos nucleados maternos utilizando marcadores de hemoglobina embrionarios únicos (Choolani et al., 2003). Sin embargo, al igual que otras células fetales, los EFp son muy raros en la sangre materna. El problema del número de células presenta todavía dificultades para su utilización en un diagnóstico prenatal fiable, incluso si pueden enriquecerse con marcadores específicos. Lo que es más, en el ser humano, este tipo de eritroblasto no se ha estudiado de forma exhaustiva, probablemente, por su presencia transitoria en el feto y su accesibilidad limitada. En las secciones que se exponen a continuación, se describirá la información reciente a cerca de la naturaleza y las propiedades de los EFp y se explicarán algunos enfoques nuevos sobre cómo se puede manipular este tipo de célula fetal para aumentar el número de células para DPNI.

Por consiguiente, según un aspecto, se proporciona un método para identificar al menos un eritroblasto fetal primitivo humano en una muestra, consistiendo dicho método en:

- (i) proporcionar al menos una célula CD45 negativa nucleada a partir de la muestra; y
- (ii) analizar la morfología de dicha al menos una célula CD45 negativa nucleada por tinción del núcleo y determinar la relación entre el citoplasma y el núcleo, según el área, de dicha al menos una célula con el núcleo teñido de una muestra, en donde si la al menos una célula CD45 negativa tiene una relación entre el citoplasma y el núcleo, según el área, en el intervalo de 16:1 a 9:1 y al menos una de las características seleccionadas entre
  - a. tener un diámetro de célula dentro del intervalo de 10-20 µm;
  - b. no ser adherente dentro de una superficie celular no pegajosa lisa;
  - c. ser maleable; y/o
  - d. ser de forma globular,

la al menos una célula CD45 negativa se identifica como un eritroblasto fetal primitivo humano, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre materna, sangre del cordón umbilical, líquido amniótico, muestra de vellosidades coriónicas, sangre fetal y tejido fetal, y en donde el eritroblasto fetal primitivo humano identificado se puede cultivar.

Ventajosamente, estas características pueden proporcionar una identificación simple pero precisa de células fetales en una muestra. Además, el método de identificación del eritroblasto fetal de acuerdo con el aspecto de la presente invención expuesto puede proporcionar soluciones que incluyen:

- un método de selección, recogida y aislamiento de cada EFPh individual;
- un entorno de cultivo *in vitro* limpio y puro para observar, cultivar y estudiar el proceso de enucleación de EFPh aislado a partir de sangre materna;
- ayudar a extender el mantenimiento y/o la viabilidad de EFPh *in vitro* aisladas de sangre materna; y/o
- mejorar/potenciar la detección de genes que de otro modo podrían ser difíciles de detectar por la naturaleza cerrada/condensada de los EFPh.

Los eritroblastos fetales pueden tener una relación relativamente alta entre el citoplasma y el núcleo en vista de sus núcleos altamente condensados y citoplasma grande. El eritroblasto fetal tendrá una alta relación entre el citoplasma y el núcleo que oscila entre 16: 1 y 9: 1. La característica de tener una relación relativamente alta entre el citoplasma y el núcleo (por área) permite ventajosamente la identificación específica y fácil de eritroblastos fetales sin la necesidad de recurrir a tinción celular específica. Esto reduce ventajosamente la cantidad de tiempo y/o costes requeridos para preparar la muestra antes del aislamiento. Sin limitar el alcance de la presente invención, se cree

que la característica de una relación alta entre el citoplasma y el núcleo se debe a los núcleos altamente condensados y la naturaleza de un citoplasma grande del eritroblasto fetal.

5 El eritroblasto fetal identificado puede identificarse además por tener un diámetro promedio dentro del intervalo de 10-20  $\mu\text{m}$ , 12-18  $\mu\text{m}$  o 14-17  $\mu\text{m}$ . Más particularmente, el eritroblasto fetal puede tener un diámetro promedio de 15-16  $\mu\text{m}$ .

10 Otras características que pueden utilizarse para identificar eritroblastos fetales incluyen la falta de adherencia y/o la naturaleza globular de estos eritroblastos fetales. El eritroblasto fetal tiene una superficie celular suave y no pegajosa y puede ser maleable durante la aspiración de células hacia la micropipeta. El eritroblasto fetal también puede tener una forma más globular en comparación con los glóbulos rojos que son bicóncavos. Estas características permiten que el eritroblasto fetal se pueda aspirar y expulsar fácilmente con instrumentos como pipetas sin dañar el eritroblasto.

15 Se puede utilizar un método de aislamiento de al menos una célula de una muestra, comprendiendo el método, identificar la célula fetal de acuerdo con el método tal como se describe en la presente invención y aislar la célula fetal utilizando un medio capaz de aislar la célula fetal individual.

20 De acuerdo con un segundo aspecto, se proporciona un método para cultivar al menos un eritroblasto fetal primitivo humano a partir de una muestra, comprendiendo dicho método:

- 25 (i) identificar al menos un eritroblasto fetal primitivo humano de acuerdo con la reivindicación 1;  
 (ii) aislar el al menos un eritroblasto fetal humano identificado en (i) utilizando un micromanipulador; y  
 (iii) cultivar el al menos un eritroblasto fetal humano aislado en (ii) en un medio que comprende IMDM (medio de Dulbecco modificado con Iscove), 30 % de FBS (suero bovino fetal), 1 % de BSA (albúmina de suero bovino,  $10^{-4}$  moles/l  $\beta$ -mercaptoetanol, 100  $\mu\text{g/ml}$  de transferrina saturada con hierro.

30 Hay muchos protocolos disponibles para enriquecer eritroblastos fetales a partir de muestras de sangre materna, como clasificación de células activadas por fluorescencia, clasificación de células activadas magnéticamente, centrifugación de gradiente de densidad, métodos basados en lectina y similares. Sin embargo, la recuperación y la pureza de las células diana a partir de estos protocolos pueden considerarse generalmente bajas. Los eritroblastos fetales puros utilizados para las pruebas de diagnóstico prenatal son importantes para obtener resultados precisos. Para abordar este problema, este método de aislamiento utiliza una técnica de micromanipulación para aislar EFPh individuales de la sangre materna.

35 El aislamiento de la célula fetal nucleada de mamífero de la muestra se puede realizar utilizando un micromanipulador. La célula fetal puede ser un eritroblasto fetal primitivo o humano.

40 Se ha adoptado el concepto de micromanipulación de los programas de fertilización *in vitro* en los que se utilizan 2 micropipetas; una para mantener el ovocito en la posición correcta y el otro para recoger un solo espermatozoide bajo el microscopio para ser inyectado en el ovocito. El método de micromanipulación utilizado en este punto requiere solo una micropipeta que puede adaptarse con un diámetro interno de entre 20 y 25  $\mu\text{m}$  para ajustarse al tamaño de la célula diana y un extremo plano para evitar daños físicos en las células.

45 Es posible obtener un eritroblasto fetal aislado de acuerdo con cualquiera de los métodos de la presente invención.

#### **Micromanipulación y cultivo de microgotas de eritroblastos fetales primitivos (EFp)**

50 Además de los métodos de separación en los que se utilizan gradientes de densidad y separación de flujo para mejorar el enriquecimiento y la pureza de los EF de la sangre materna, los métodos de micromanipulación utilizados en los programas de FIV para recoger espermatozoides individuales con micropipetas con el microscopio para la inyección intracitoplasmática en un ovocito (ICSI) sería un nuevo método de separación de EFp de las células maternas. Se desarrolló un sistema eficiente utilizando un sistema de micromanipulación Zeiss-Narashige y micropipetas de calibre 20  $\mu\text{m}$  para recoger EFp individuales. Además, se utilizaron 10  $\mu\text{l}$  de microgotas de medio de cultivo bajo aceite mineral equilibrado estéril (Sigma Chemical Co, MO) para albergar y observar la enucleación de EFp individual y llevar un seguimiento de su comportamiento celular y su crecimiento *in vitro*. Las microgotas de medio de cultivo contenían poblaciones puras de EFp (Figura 1). Su comportamiento de crecimiento y número se pueden rastrear con precisión a lo largo del tiempo ya que no hay contaminación de otros tipos de células comúnmente presentes en la sangre. Con este sistema de cultivo de microgotas, se pueden estudiar los efectos de los diferentes entornos de gas, la composición del medio, los mitógenos y los factores de crecimiento en los EFp para desarrollar el entorno de cultivo óptimo para la expansión de los EFp.

60 Se han empleado gradientes de densidad y métodos de separación de flujo para mejorar el enriquecimiento y la pureza de los EF de la sangre materna. Sin embargo, estos métodos aún contendrían una mezcla de algunos tipos de células distintas. Por el contrario, el método de micromanipulación que se utiliza convencionalmente en los programas de Fertilización *In vitro* (FIV) para recoger espermatozoides individuales con micropipetas con

microscopio para la inyección intracitoplasmática en un ovocito (ICSI) sería un método novedoso para separar EFPh de las células maternas. Se desarrolló un sistema eficiente y limpio utilizando un sistema de micromanipulación Zeiss-Narashige y micropipetas de calibre 20 µm para seleccionar, recoger y aislar EFPh individuales. Por otra parte, se utilizaron microgotas de 10 µl de medio de cultivo bajo aceite mineral estéril equilibrado (Sigma Chemical Co, Se usó MO) para albergar y observar la enucleación de EFPh individual y llevar un seguimiento de su comportamiento celular y su crecimiento *in vitro*. Las microgotas de medio de cultivo contenían poblaciones puras de EFPh. La combinación de ambos métodos, concretamente, la micromanipulación, para seleccionar, recoger y aislar EFPh manualmente y el posterior cultivo de microgotas permite (1) estudiar el proceso de enucleación y el comportamiento de crecimiento, y (2) rastrear un número fijo de células con precisión a lo largo del tiempo y posiblemente prolongar su viabilidad *in vitro*. Esta estrategia ofrecería un sistema muy limpio de cultivo de EFPh homogéneo para su uso en futuros DPNI.

**Manipulación de EFp para DPNI**

**- Cultivo ex vivo de EFp**

Durante muchos años, muchos equipos de trabajo han intentado la expansión *ex vivo* en el cultivo de células fetales de sangre materna para proporcionar un número de células adecuado para un DPNI fiable (Tabla 1). Se han empleado células precursoras eritroides fetales, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales y células precursoras endoteliales para dicho cultivo de expansión ya que tienen potencial para proliferar *ex vivo*. Sin embargo, existen dos desafíos principales en dicha expansión del cultivo: (1) enriquecer las pocas células fetales diana a partir del gran número de glóbulos maternos y (2) desarrollar el sistema de cultivo óptimo que favorezca el crecimiento de células fetales sobre las células maternas. Cuando se examinó el sexo de las células cultivadas utilizando hibridación *in situ* fluorescente (FISH), PCR y técnicas de tinción de hemoglobina fetal, la mayoría de las células expandidas resultaron ser de origen materno a pesar de los diversos sistemas de cultivo utilizados (Chen et al., 1998; Han et al., 1999; Bohmer et al., 2002). Esto fue más probable debido a la escasez de células fetales en la sangre materna. Un marcador específico para distinguir las células fetales de las células maternas es, por lo tanto, crítico en la etapa de enriquecimiento. Es necesario desarrollar una combinación óptima de citoquinas que permita el crecimiento de células fetales sobre las maternas.

Año	Autores	Tipo de célula	Gestación en semanas	Nº de muestras	Ensayos
1994	Lo et al.	Células eritroides	11 - 20	5	FISH
1996	Valerio et al.	BFU-E, CFU-E	14 - 16	8	PCR, FISH, HbF
1997	Little et al.	Células CD34+	10 - 13	42	FISH
1997	Valerio et al.	BFU-E, CFU-E, CFU-GEMM	17 - 22	7 *	FISH
1998	Chen et al.	BFU-E, CFU-E	9 - 17	16	PCR, FISH, HbF
1999	Han et al.	Células CD71/GPA+	10	1	PCR, HbF
1999	Bohmer et al.	Glóbulos rojos nucleados	18	1	FISH
2000	Jansen et al.	Células CD34+	7 - 16	65	FISH
2000	Valerio et al.	Células eritroides	19	1 *	FISH
2000	Huber et al.	Células eritroides	12, 17	26	PCR, FISH, HPLC
2000	Tutschek et al.	BFU-E, CFU-GM	14 - 20	14	PCR
2001	Coata et al.	Células CD34+	11 - 16	31	PCR, FISH
2001	Han et al.	Células eritroides	8 - 14	10	PCR, HbF
2002	Campagnoli et al.	Células CD34+	10 - 40	49	FISH
2002	Zimmermahn et al.	Células eritroides	13 -41	16	PCR
2002	Manotaya et al.	Células CD34+	5 - 21	17	PCR, FISH
2002	Gussin et al.	células precursoras endoteliales	13 - 26	13	FISH
2002	Bohmer et al.	Glóbulos rojos nucleados	11 - 25	25	PCR, FISH
2003	Donoghue et al.	CMM Fetales	7 - 13	20	FISH

Tabla 1: Cultivo *ex vivo* de células fetales de sangre materna para diagnóstico prenatal no invasivo (DPNI). \* indica trisomía

Hasta el momento no se ha realizado ningún estudio sobre el cultivo *ex vivo* de eritroblastos primitivos humanos del primer trimestre de sangre materna. Esto se puede achacar a que los eritroblastos primitivos humanos son más predominantes al principio de la gestación (Choolani et al., 2001; 2003), y el conocimiento generado para este tipo de célula es limitado. Se desconoce el comportamiento del eritroblasto primitivo humano *ex vivo*, pero a partir de lo que ya se conoce en la eritropoyesis primitiva murina, el eritroblasto primitivo en una etapa temprana de diferenciación puede proliferar durante unos cuantos ciclos para dar lugar a células hijas más maduras (Palis et al.,

2010). Por lo tanto, queda pendiente de estudio el perfil del ciclo celular de los eritroblastos primitivos en diferentes semanas de gestación y el porcentaje de células en varias fases mitóticas que pueden analizarse. Con dicha información, es posible saber a qué edad gestacional los eritroblastos primitivos tienen un mayor potencial de proliferación para cultivo *ex vivo* para DPNI.

5 El método de cultivo de al menos un eritroblasto fetal primitivo humano puede comprender cultivar la célula en un medio que comprende al menos un mitógeno y/o al menos un factor epigenético. El medio de cultivo de la presente invención, mejora sorprendentemente la viabilidad de las células fetales *in vitro*. Sin al menos un mitógeno y/o al menos un factor epigenético, las células fetales no pueden cultivarse *in vitro* durante un período de tiempo  
10 prolongado (es decir, más de un día). Por lo tanto, el medio puede tener la capacidad de aumentar la viabilidad de la célula fetal.

**- Mitógenos**

15 Los mitógenos son sustancias químicas que estimulan una célula para comenzar la división celular. Por lo general, desencadenan rutas de señalización, como la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), que conduce a la mitosis. Concanavalina A, fitohemaglutinina y mitógeno de pokeweed son mitógenos comunes que se utilizan habitualmente para estimular la proliferación de linfocitos en la medicina de laboratorio clínico. Tras la  
20 exposición a estos mitógenos, se activan los linfocitos y pueden dividirse de nuevo y producir respuestas inmunitarias. Dado que los EFp también son de un linaje sanguíneo como los linfocitos, sería interesante examinar los efectos de estos mitógenos en los EF para estimular la mitosis y aumentar el número de células para el DPNI. Pueden activarse algunas vías de señalización y, como resultado, estos mitógenos pueden mejorar el potencial proliferativo de EFp humano.

25 Los mitógenos son sustancias químicas que promueven la división celular. Las vías de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y las vías reguladoras del ciclo celular están influidas por estos mitógenos, que conducen a mitosis. Algunos de los mitógenos comunes utilizados para estimular la proliferación de linfocitos son Concanavalin A, fitohemaglutinina y mitógeno de pokeweed. Sería interesante examinar los efectos de estos mitógenos sobre los EFPh para estimular la mitosis y aumentar el número de células para DPNI. La activación de MAPK y otras vías  
30 reguladoras del ciclo celular a través de estos mitógenos puede mejorar el potencial proliferativo de EFPh. El mitógeno de pokeweed podría extender la viabilidad de los EF de manera significativa *in vitro*.

En particular, los mitógenos que se pueden utilizar en el medio de cultivo de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a concanavalina A, fitohemaglutinina, lipopolisacárido (LPS), factores  
35 de crecimiento de tipo insulina (IGF), mitógeno de pokeweed y/o similares.

**- Factores epigenéticos/moléculas pequeñas en cultivos *ex vivo*, mantenimiento y expansión de EFPh**

40 Muchos equipos de trabajo han intentado la expansión *ex vivo* en cultivo de células fetales a partir de sangre materna para proporcionar un número de células adecuado para un DPNI fiable (Lo et al., 1994; Valerio et al., 1996; Chen et al., 1998; Jansen et al. al., 2000; Han et al., 2001; Zimmerman et al., 2002; Donoghue et al., 2003). De los diversos tipos de células fetales, el eritroblasto humano primitivo (EFPh) es una célula posible candidato para el DPNI durante el primer trimestre, ya que estas células tienen marcadores de identificación únicos (globulina)  
45 (Choolani et al., 2001; 2003). La enucleación es un fenómeno natural en la maduración de los eritroblastos fetales murinos. Sin embargo, los conocimientos actuales sobre la maduración, la enucleación y otras propiedades de eritroblastos primitivos humanos son limitados. Sin embargo, la retención del núcleo dentro del citoplasma se hace indispensable antes de que pueda realizarse un diagnóstico genético por DPNI. Por lo tanto, es posible que sea necesario retrasar el proceso de enucleación de alguna forma si tiene lugar la enucleación también en los seres humanos. Estudios recientes sobre eritroblastos definitivos en ratones han demostrado que la desacetilación de  
50 histonas inducida por la histona desacetilasa (HDAC) desempeña un papel importante en la condensación y enucleación nuclear de eritroblastos definitivos (Popova et al., 2009; Ji et al., 2010). Cuando se añadieron inhibidores de la HDAC, como la tricostatina A, a los eritroblastos definitivos del ratón, se inhibieron la condensación nuclear y la enucleación. Es necesario evaluar si los inhibidores de HDAC retrasan o no la enucleación de los EFPh. Los inhibidores de HDAC pueden descondensar el núcleo del EFPh. Es posible que esto pueda desempeñar  
55 un papel importante, que puede ser retrasar o prevenir la enucleación y por tanto prolongar su viabilidad *in vitro* y por tanto permitir el diagnóstico prenatal después del período de retraso de al menos 48 a 72 horas.

El eritroblasto primitivo es una buena célula diana para el DPNI del primer trimestre. La mayor parte del conocimiento acerca de la naturaleza y las propiedades de los eritroblastos primitivos se obtienen a partir de  
60 modelos murinos y, por lo tanto, es difícil sacar conclusiones sobre la maduración, la enucleación y otras propiedades de los eritroblastos primitivos humanos. Si los eritroblastos primitivos humanos se enuclean *in vivo*, es posible que valga la pena estudiar este fenómeno *in vitro* para la aplicación de un DPNI. El núcleo debe mantenerse dentro del citoplasma antes de que se pueda realizar un diagnóstico genético y, por lo tanto, será necesario retrasar de alguna forma el proceso de enucleación si la enucleación tiene lugar *in vitro*. Estudios recientes sobre  
65 eritroblastos definitivos en ratones han demostrado que la desacetilación de histonas inducida por la histona desacetilasa (HDAC) desempeña un papel importante en la condensación nuclear y enucleación de eritroblastos

definitivos (Popova et al., 2009; Ji et al., 2010). Cuando se añadieron inhibidores de la HDAC, como la tricostatina A, a los eritroblastos definitivos del ratón, se inhibieron la condensación nuclear y la enucleación. Por lo tanto, cabría preguntarse si los inhibidores de HDAC retrasan también la enucleación de los eritroblastos primitivos. Los inhibidores de HDAC pueden descondensar el núcleo del eritroblasto primitivo humano y pueden desempeñar un importante papel en la enucleación. Sin embargo, los mecanismos que hay detrás de la enucleación de eritroblastos primitivos pueden ser diferentes de los del eritroblasto definitivo.

Los factores epigenéticos que pueden incluirse en el medio de cultivo incluyen, pero sin limitarse a ellos, al menos un agente que promueve la descondensación de un núcleo y/o al menos un agente que retrasa la enucleación. El agente que promueve la descondensación de un núcleo puede ser un inhibidor de la histona deacetilasa que puede incluir, pero sin limitarse a ellos, tricostatina A (TSA), ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA) o vorinostat, belinostat, panobinostat, oxamflatina, depsipéptidos, trapoxinas, depudecina, MS-27-275, ácido valproico, ácido butírico y apicidina. El agente que retrasa la enucleación es el inhibidor de la ADN metil transferasa que puede incluir, pero sin limitarse a ellos, 5-azacitidina, 5-aza-2-desoxicitidina, 1-β-D-arabinofuranosil-5azacitosina, dihidro-5-azacitidina, zebularina, procaina, epigallocatequina -3-galato (EGCG), RG108, L-etionina, clorhidrato de procainamida, psammoplinas, clorhidrato de hidralacina, oligonucleótido MG98 y similares.

En particular, el método de cultivo de la célula fetal se puede llevar a cabo en condiciones normóxicas. Más particularmente, la célula fetal puede cultivarse en condiciones normóxicas con un nivel de oxígeno de aproximadamente 18 %, aproximadamente 22 %, aproximadamente 19 %, aproximadamente 21 % o aproximadamente 20 %, aproximadamente 21,5 %.

En particular, el método para cultivar la célula fetal de acuerdo con la presente invención mantiene la célula fetal en un medio que puede ser capaz de aumentar la viabilidad del eritroblasto fetal. Más particularmente, el medio puede ser capaz de mantener la viabilidad celular del eritroblasto fetal durante al menos 48 horas, 72 horas, 1 semana, 2 semanas y similares.

En particular, el método para cultivar la célula fetal de acuerdo con la presente invención puede mantener la célula fetal en una microgotas. Más particularmente, se pueden recubrir las microgotas con al menos un aceite. La presencia del aceite puede prevenir la evaporación y el enfriamiento rápido del medio de cultivo que contiene la célula fetal.

El aceite que se puede usar en el método de cultivo puede incluir, sin limitarse a ellos, aceite mineral, aceite de silicona, aceite vegetal, y similares. En particular, el aceite que se utilice de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invención puede ser al menos un aceite mineral. El término "aceite mineral" se refiere a cualquier mezcla ligera, inodora e incolora de alcanos en el intervalo de C15 a C40 de una fuente no vegetal. El aceite mineral, tal como se emplea en el presente documento, es un aceite mineral equilibrado que se puede obtener cuando se mezcla el aceite mineral con el medio de cultivo y se incuba hasta que todos los nutrientes del medio de cultivo se han difundido en el aceite mineral, alcanzando así el equilibrio en el contenido de nutrientes entre el aceite mineral y el medio de cultivo.

El método de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invención puede incluir métodos para aislar y expandir estos EFPPh para su uso en un futuro DPNI. Estos incluyen (1) el uso de métodos de micromanipulación para seleccionar, recoger y aislar individualmente los EFPPh, (2) el uso del método de cultivo de microgotas para purificar y estudiar los EFPPh de sangre materna como una población celular homogénea, (3) el uso de mitógenos para aumentar el número de EFPPh y (4) el uso de factores epigenéticos/moléculas pequeñas para descondensar el núcleo y activar la transcripción de genes para facilitar la proliferación de EFPPh. Todas estas nuevas estrategias permiten un DPNI con éxito. Una vez que se recogen y aíslan los EFPPh, es posible enviarlos para las pruebas genéticas si el número es suficiente o se pueden expandir utilizando un sistema de cultivo de microgotas *in vitro* como se muestra en la Figura 1. La mayor parte de los equipos de trabajo han cultivado progenitores eritroides fetales desde sangre materna en un gran volumen de medio en un disco Petri con vistas a que aumente el número de células fetales para el diagnóstico, pero debido a la contaminación de las células maternas fetales en cultivo, no se ha logrado una amplificación selectiva de células fetales sobre las maternas.

Se podría utilizar un método para promover y/o facilitar la proliferación de al menos una célula fetal *ex vivo*, comprendiendo dicho método el contacto de al menos un mitógeno con la célula fetal. En particular, el mitógeno puede seleccionarse del grupo que consiste en concanavalina A, fitohemaglutinina, lipopolisacárido (LPS), factores de crecimiento de tipo insulina (IGF) y pokeweed. La célula fetal que se puede utilizar en el método de acuerdo con la presente invención puede ser eritroblastos fetales primitivos humanos.

En particular, la célula fetal puede ser un eritroblasto fetal. Más en particular, la célula fetal puede ser un eritroblasto fetal de mamífero. Aún más en particular, la célula fetal puede ser eritroblasto fetal humano.

Un medio para cultivar al menos una célula fetal puede comprender al menos un mitógeno y/o al menos un factor epigenético y/o el medio está desprovisto de al menos un factor de crecimiento. En particular, el medio puede ser capaz de aumentar la viabilidad del eritroblasto fetal. Más en particular, el medio puede ser capaz de mantener la

viabilidad celular del eritroblasto fetal durante al menos 48 horas.

En particular, el medio de cultivo puede comprender mitógeno que puede seleccionarse del grupo que consiste en concanavalina A, fitohemaglutinina, lipopolisacárido (LPS), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) y pokeweed. Más en particular, el medio de cultivo puede comprender además un agente que retrasa la enucleación y/o promueve la descondensación de un núcleo.

**Reprogramación nuclear de EFp**

**- Reprogramación viral y no viral**

Un avance reciente en el campo de la biología de células madre ha sido la generación de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) a partir de células somáticas por expresión ectópica de una batería de cuatro genes, a saber, KLF4, OCT4, SOX2 y c-MYC (factores KOSM) (Takahashi et al., 2007). Ahora está claro que las células somáticas diferenciadas pueden revertirse al estado embrionario utilizando técnicas de reprogramación nuclear que incluyen transferencia nuclear de células somáticas (SCNT), fusión celular, extractos sin células y enfoque iPSC. En la reprogramación nuclear, el contenido de ADN celular no se perderá durante la diferenciación celular, pero el estado de transcripción de todos los genes cambia de forma dinámica y constante por modificaciones epigenéticas para adaptarse al papel funcional que desempeña la célula en una etapa de desarrollo en particular y en un emplazamiento del cuerpo en particular. Después del informe de Takahashi et al. (2006), otro equipo de trabajo demostró más adelante que con el uso de LIN28 en lugar de KLF4 en los factores KOSM, se podían generar los mismos iPSC a partir de células somáticas (Yu et al., 2007). Estos seis genes utilizados para la producción de iPSC desempeñan un esencial papel en el mantenimiento de la pluripotencia y el potencial de auto-renovación indefinido en las células madre embrionarias. En las células diferenciadas, estos genes pueden haberse detenido o expresado a niveles muy bajos para evitar potencias celulares innecesarias. Al introducir estos genes activos nuevamente en la célula, se transcribirán y se traducirán a factores de transcripción activos que actúan en el genoma celular y activan ciertas expresiones genéticas, cambiando así el perfil de transcripción de la célula y revirtiéndolo de nuevo a un estado embrionario. Inicialmente, se utilizaron los vectores retrovirales y lentivirales que llevan los factores de reprogramación para generar iPSC por su eficacia superior en el suministro de genes en comparación con los métodos de transfección no viral. Sin embargo, la integración viral en el genoma de la célula hospedadora puede conducir a mutagénesis de inserción, lo cual plantea problemas para su aplicación clínica. Poco después del éxito de la producción de iPSC a partir de varios tipos de células somáticas, se desarrollaron rápidamente enfoques no virales para evitar el uso de virus para la generación de iPSC. En el sistema de transposón piggyback /transposasa recientemente diseñado, se insertaron transgenes flanqueados por repeticiones terminales piggyBac en el genoma hospedador y se eliminaron una vez establecida la pluripotencia (Woltjen et al., 2009). En este punto, no hubo integración genómica residual en la célula hospedadora y, por lo tanto, el genoma de la célula huésped no se cambió sino que se activó al estado embrionario. La transfección repetida transitoria de células con plásmidos únicamente también ha resultado en la generación de iPSC, aunque la eficiencia fue extremadamente baja (Okita et al., 2010). Además de los métodos basados en el transgen, el suministro directo de proteínas (Kim et al., 2009; Zhou et al., 2009) y el ARN mensajero que codifica los factores de transcripción (Yakovov et al., 2010) también tuvieron la capacidad de generar iPSC.

**- Uso de moléculas pequeñas para reprogramación**

Cabe destacar que se ha demostrado que muchas moléculas pequeñas pueden potenciar significativamente la eficiencia de la generación iPSC (Li y Ding, 2009). Por ejemplo, al utilizar moléculas pequeñas SB431542 y PD0325901 para inhibir las vías de TGF y MAPK/ERK, los fibroblastos humanos podrían reprogramarse con los factores KOSM con una eficiencia 200 veces mejorada (Lin et al., 2009). Algunas de las moléculas pequeñas pueden incluso reemplazar uno o más de los factores de reprogramación. Por ejemplo, se reprogramaron fibroblastos humanos en iPSCs solo con OCT4, SOX2 y adición de ácido valproico (VPA) (Huangfu et al., 2008). El ácido valproico, un inhibidor de la HDAC, puede aumentar la acetilación de histonas, activando así la transcripción de ciertos genes cuyos promotores fueron reprimidos previamente debido a la desacetilación de histona. En un estudio reciente, se reprogramaron queratinocitos humanos neonatales en iPSCs únicamente con OCT4 y un cóctel de compuestos químicos que modulan el estado epigenético, el metabolismo celular y las rutas de señalización (Zhu et al., 2010). Cabe destacar que este estudio indicó que un cambio metabólico en glucólisis anaeróbica utilizado principalmente por las células pluripotentes es importante para reprogramar las células somáticas al estado pluripotente. Las moléculas pequeñas que modulan diferentes aspectos de las actividades celulares pueden conducir en última instancia al objetivo de reprogramar las células con solo moléculas químicas sin transgenes.

**- Eficiencia de reprogramación**

Además de la cuestión de la seguridad, la eficiencia de la reprogramación de la tecnología iPSC constituye otra gran preocupación a la hora de considerar sus aplicaciones clínicas. Los métodos de reprogramación mediados por virus son más eficientes que los métodos no virales, pero aun así solo pueden alcanzar hasta un 1 % de eficiencia con la ayuda de moléculas pequeñas. Los enfoques no virales son más idóneos, pero en general tienen una eficacia muy baja que oscila entre el 0,001 % y el 0,01 % (Kiskinis y Eggan, 2010). La eficiencia de la reprogramación también

depende del tipo de célula diana. Las células menos diferenciadas, como las células progenitoras y las células madre, pueden reprogramarse con una eficiencia mucho mayor en comparación con los tipos de células diferenciadas terminalmente, como los fibroblastos adultos de piel y los linfocitos de la sangre periférica. Esto es probablemente debido al hecho de que en una célula totalmente diferenciada, se deben cambiar más funciones necesarias para la diferenciación antes de que la célula pueda volver a un estado no diferenciado. Según el conocimiento actual, la reprogramación de iPSC en sí misma es un proceso estocástico, pero susceptible de aceleración (Hanna et al., 2009). El uso de moléculas pequeñas puede mejorar considerablemente la eficiencia de la reprogramación al preestablecer las células diana a un estado más reprogramable que permita los efectos inmediatos de los factores de reprogramación en las células.

**- Reprogramación de célula para diagnóstico prenatal no invasivo (DPNI)**

A medida que avance la tecnología iPSC, se desarrollarán estrategias de reprogramación más seguras dirigidas a una gama más amplia de tipos de células con mayor eficiencia en un futuro próximo. Será beneficioso en el campo de la medicina fetal que la técnica iPSC se pueda aplicar a las células fetales. Las células fetales del líquido amniótico y las vellosidades coriónicas se han reprogramado con éxito en las iPSC (Ye et al., 2009) lo cual, a su vez, puede diferenciarse en tejidos deseables para la terapia fetal intrauterina. Además, las células fetales pueden tener una mayor eficiencia de reprogramación para iPSC o requieren un número menor de factores de reprogramación que las células adultas debido a las mutaciones somáticas mínimas y los niveles de expresión endógenos más altos de los factores de reprogramación. La generación iPSC a partir de sangre humana ha despertado un gran interés recientemente ya que la sangre está fácilmente disponible y el procedimiento de extracción no es tan invasivo. Las iPSC se han generado con éxito a partir de células madre hematopoyéticas, linfocitos T y células mieloides (Staerk et al., 2010), pero no a partir de células eritroides (Tabla 2). En las circunstancias de un DPNI que utilice células fetales de sangre materna, si el reducido número de células fetales enriquecidas pudiera reprogramarse en iPSC (Figura 2), el número de células ya no serían un problema para realizar un diagnóstico fiable ya que las iPSC resultantes serán proliferativas y al mismo tiempo pueden diferenciarse para terapias basadas en células. Dado que el EFp es una célula diana idónea para DPNI, puede ser útil aplicar varios métodos iPSC para ver si se puede reprogramar y amplificarse su número a través de la generación de colonias similares a CMEh que se dividen activamente. Habría desafíos técnicos en la producción de iPSC a partir de pequeñas cantidades de EFp, dada la baja eficiencia general de la reprogramación. A medida que la tecnología de reprogramación se vuelva más y más eficiente, refinada y establecida, la manipulación de las células fetales en la sangre materna tanto para DPNI como para terapia basada en células fetales puede convertirse en una realidad en el futuro.

Tipo de célula	Factores de reprogramación	Método de entrega	Eficiencia	Factores de referencia
Células CD34+ de sangre periférica humana movilizadas	4Oct, Sox2, c-Myc, Klf4	Vectores retrovirales	0,01 % - 0,02 %	Loh YH et al., 2009
Sangre de cordón humano-células endoteliales derivadas	4Oct, Sox2, Nanog, Lin28	Vectores Lentivirales	0,01 % - 0,03 %	HaaseA et al.2009
Sangre de cordón humano-células CD133+ derivadas	4Oct, Sox2, c-Myc, Klf4	Vectores retrovirales	0,002 % - 0,007 %	Glorgettl A, et al., 2009
Linfocitos de ratón maduro B	Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4, c/EBP Q	vectores lentivirales inducible con doxiciclina	0,01 % - 0,1 %	Hanna J et al., 2008
Linfocitos T humanos de sangre periférica	Oct4, Sox2 c-Myc, Klf-4	vectores lentivirales policistrónicos inducible con doxiciclina-	0,0002 % - 0,001 %	Staerk J et al., 2010

Tabla 2: Generación de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) a partir de células sanguíneas utilizando métodos de reprogramación viral.

Según otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar al menos un trastorno prenatal en un feto, comprendiendo el método:

- i. cultivar al menos un eritroblasto fetal primitivo de acuerdo con el segundo aspecto;
- ii. determinar al menos un marcador genético asociado con el trastorno prenatal en el eritroblasto fetal;

en donde el método es *in vitro*.

La célula fetal es un eritroblasto fetal humano

El trastorno prenatal que se selecciona del grupo que consiste en síndrome de Down, síndrome de Edwards, síndrome de Patau, un defecto del tubo neural, espina bífida, paladar hendido, enfermedad de Tay Sachs, anemia de células falciformes, talasemia, fibrosis quística, síndrome de X frágil, atrofia muscular espinal, distrofia miotónica,

enfermedad de Huntington, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, hemofilia, distrofia muscular de Duchenne, trastorno mitocondrial, exostosis múltiple hereditaria y trastorno de osteogénesis imperfecta.

5 La muestra puede seleccionarse del grupo que consiste en tejido materno, sangre materna, sangre del cordón umbilical, amniocitos, muestra de vellosidades coriónicas, sangre fetal, tejido fetal, y similares.

10 Las personas expertas en la materia apreciarán que la presente invención puede ponerse en práctica sin experimentación indebida de acuerdo con el método que se proporciona en el presente documento. Los métodos, técnicas y productos químicos son como se describen en las referencias dadas o de protocolos en manuales de biotecnología y biología molecular convencionales.

### Ejemplos

15 Se siguieron las técnicas de biología molecular convencionales conocidas en la técnica y no descritas específicamente generalmente tal como se describe en Sambrook y Russei, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (2001).

20 En lo expuesto hasta aquí, se describen realizaciones preferentes, que, tal como entenderán las personas expertas en la técnica, pueden estar sujetas a variaciones o modificaciones en cuanto al diseño, la construcción o el funcionamiento sin por ello apartarse del alcance de las reivindicaciones. Se pretende que dichas variaciones, por ejemplo, queden cubiertas por el alcance de las reivindicaciones.

### Ejemplo 1

#### 25 Método de selección, recogida y aislamiento de cada EFPh individual

30 Durante el proceso de recogida de células, se siguieron algunos criterios para ayudar a identificar los EFPh de la población en masa de glóbulos rojos adultos y otros tipos de células nucleadas. Estos criterios se desarrollaron sobre la base de estudios realizados en EFPh aislados de tejidos placentarios en las semanas gestaciones 8 a 10. Dichos criterios fueron: 1) los EFPh tienen un diámetro promedio de 15-16  $\mu\text{m}$ , que es aproximadamente el doble del diámetro de los RBC; 2) los EFPh son células nucleadas, por lo que pueden distinguirse de los RBC por tinción nuclear; 3) los EFPh son CD45negativos. Se puede utilizar inmunotinción de una sola etapa con FITC anti-CD45 para excluir a los glóbulos blancos CD45 positivos que constituyen la mayoría de las células nucleadas contaminantes; 4) los EFPh son células no adherentes con una superficie celular no pegajosa lisa; 5) son bastante maleables durante la aspiración celular en la micropipeta; 6) los EFPh tienen una alta relación entre el citoplasma y el núcleo (por área) que varía de 16: 1 a 9: 1, debido a sus núcleos altamente condensados y citoplasma grande; y 7) los EFPh son generalmente de forma más globular en comparación con los RBC que son bicóncavos.

40 Sobre la base de los criterios anteriores, se identificaron las células como EFPh y se separaron mediante la metodología de cultivo de micromanipulación-microgotas como se describe en la Figura 1, que describe la metodología de cultivo de micromanipulación-microgotas para el aislamiento de eritroblastos fetales primitivos (EFp) de una muestra de vellosidades coriónicas. Brevemente, A: se proporcionó una población heterogénea de células en un CVS que se encuentra en el centro de la gota grande (flecha) que se sometió previamente a la separación con un gradiente de Percoll. Ai: imagen de contraste de fase en aumento de la población celular heterogénea antes de la micromanipulación. B, C: Se recogieron individualmente EFp de CVS en la gota central grande utilizando una micropipeta de 20  $\mu\text{m}$  y un micromanipulador Zeiss-Narashige con microscopio y se transfirieron a gotas de 10 $\mu\text{l}$  de microcultivos de bajo aceite mineral estéril en la periferia para obtener poblaciones homogéneas de EFp. Ci: Imágenes de contraste de fase en aumento de EFp en las gotitas de microcultivo periférico que se pueden controlar individualmente. D: vista en sección transversal que presentan las gotitas de microcultivo de medio en una placa Petri (60 mm) cubierta por una capa delgada de aceite mineral equilibrado.

### Entorno de cultivo in vitro

55 Se utilizó un entorno de cultivo *in vitro* limpio y puro para observar, cultivar y estudiar el proceso de enucleación de EFPh aislado de sangre materna. Después de aislar los EFPh de la sangre materna, fue posible enviar los EFPh para las pruebas genéticas cuando el número fue suficiente o se pudo expandir utilizando un sistema de cultivo de micropipetas *in vitro* (Figura 1). El sistema de cultivo de microgotas se adaptó de los programas de fertilización *in vitro* en los que se cultivaron ovocitos y embriones en un pequeño medio de medio de cultivo. Este sistema de cultivo de microgotas permitió el cultivo *in vitro* de una población pura de EFPh en una gota de medio 10 $\mu\text{l}$  cubierta con aceite mineral equilibrado para evitar la evaporación. Cabe destacar que esto permitió la observación *in vitro*, el rastreo y el estudio del comportamiento biológico de cada EFPh, como la enucleación celular, por tinción y el rastreo del núcleo. Esto fue posible ya que se cultivó individualmente cada EFPh en cada gota de medio de cultivo. El medio utilizado para el cultivo celular se preparó en el laboratorio con una composición de IMDM (medio de Dulbecco modificado de Iscove) + FBS al 30 % (suero bovino fetal) + BSA al 1 % (albúmina de suero bovino) + 10<sup>-4</sup> mol/l de  $\beta$ -mercaptoetanol + 100 g/ml de transferrina saturada de hierro + 1 % AA (antibiótico antimicótico).

65 Se utilizó el sistema de cultivo de microgotas para mantener la viabilidad de EFPh *in vitro* optimizando sus

condiciones de cultivo. La viabilidad celular se midió mediante el recuento celular, es decir, contando el número de células viables y células muertas en cada punto temporal. Las células viables presentaron una membrana plasmática clara y diferenciada con microscopía de contraste de fase, mientras que las células no viables presentaron membranas desintegradas que hacían el núcleo más evidente.

Las condiciones de cultivo se optimizaron para los EFPH aislados de los tejidos placentarios y se observó que los EFPH sobrevivían mejor en un entorno normóxico que en el gaseoso hipóxico (Figura 3). Además, el mitógeno Pokeweed ayudó a mantener la viabilidad de los EFPH durante un período prolongado en el cultivo, tuvo un efecto protector sobre los EFPH y disminuyó la muerte celular, tal como se muestra en la Figura 4. El uso del sistema de cultivo de microgotas extendió así el mantenimiento y viabilidad de EFPH aislados *in vitro* de sangre materna.

### Descondensación del núcleo

La detección de genes que serían difíciles de detectar si no debido a la naturaleza cerrada/condensada de los EFPH se hizo posible por descondensación del núcleo de los EFPH aislados. El núcleo de EFPH está normalmente muy condensado y siempre ha causado dificultades para detectar los genes específicos para el diagnóstico prenatal. Se utilizaron un inhibidor de histona deacetilasa y un inhibidor de ADN metil transferasa para descondensar o remodelar la estructura de la cromatina de los EFPH. Después de tratar las células con estos factores epigenéticos, se incrementó el nivel de acetilación de histonas y se redujo el nivel de trimetilación de histonas, lo cual dio como resultado una estructura de cromatina menos condensada (Figura 5). Para evaluar los efectos de los factores epigenéticos en la detección de genes, se amplificó el genoma de los EFPH tratados y no tratados y se midieron el número de copias de la beta-globina humana (HBB) y la región Y (SRY) determinante del sexo por PCR cuantitativa. Los resultados mostraron que, en promedio, en comparación con los EFPH no tratados, los tratados con inhibidor de histona deacetilasa tenían un mayor número de copias de HBB y los tratados con ADN metil transferasa tenían un mayor número de copias de SRY (Figura 6).

### REFERENCIAS

1. Sambrook and Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (2001).
2. Antsaklis A, Daskalakis G, Papantoniou N, Michalas S. 1998. Foetal blood sampling-indication-related losses. *Prenat Diagn* 18: 934-940.
3. Babochkina T, Mergenthaler S, Napoli G De, Hristoskova S, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S. 2005. 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* 90: 740-745.
4. Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JH, Latt SM. 1990. Isolation of foetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3279-3283.
5. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, De Maria MA. 1996. Male foetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 705-708.
6. 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. 2002. Foetal gender and aneuploidy detection using foetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Foetal Cell Isolation Study. *Prenat Diagn* 22: 609-615.
7. Bohmer RM, Zhen DK, Bianchi DW. 1999. Identification of foetal nucleated red cells in co-cultures from foetal and adult peripheral blood: differential effects of serum on foetal and adult erythropoiesis. *Prenat Diagn* 19: 628-636.
8. Bohmer RM, Johnson KL, Bianchi DW. 2001. Foetal and maternal progenitor cells in co-culture respond equally to erythropoietin. *Prenat Diagn* 21: 818-823.
9. Bohmer RM, Stroh HP, Johnson KL, LeShane ES, Bianchi DW. 2002. Foetal cell isolation from maternal blood cultures by flow cytometric hemoglobin profiles. *Foetal Diagn Ther* 17: 83-89.
10. Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam SS. 1994. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod* 9: 2110-2117.
11. Buscaglia M, Ghisoni L, Bellotti M, Ferrazzi E, Levi-Setti P, Marconi AM, Taglioretti A, Zamperini P, Pardi G. 1996. Percutaneous umbilical blood sampling: indication changes and procedure loss rate in a nine years' experience. *Foetal Diagn Ther* 11: 106-113.
12. Busch J, Huber P, Holtz J, Pfluger E, Radbruch A. 1994. Simple and fast 'double-MACS' sorting of foetal erythroblasts from maternal blood for PCR-based paternity analysis. *Ann NY Acad Sci* 731: 144-146.
13. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Choolani M, Bennett PR, Letsky E, Fisk NM. 2002. Expandability of haemopoietic progenitors in first trimester foetal and maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 22: 463-469.
14. Cha, D. et al 2003. A simple and sensitive erythroblast scoring system to identify fetal cells in maternal blood. *Prenat Diagn* 23: 68-73.
15. Chen H, Griffin DK, Jestice K, Hackett G, Cooper J, Ferguson-smith MA. 1998. Evaluating the culture of foetal erythroblasts from maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 18: 883-892.
16. Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YM. 2002. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* 360:998-1000.

17. 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, Minekawa R, Tang MH, Wang J, Oudejans CB, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM. 2011. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ* doi: 10.1136/bmj.c7401.
- 5 18. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. 1998. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125:725-732.
19. Choolani M, O'Donnell H, Campagnoli C, Kumar S, Roberts I, Bennett PR, Fisk NM. 2001. Simultaneous foetal cell identification and diagnosis by epsilon-globin chain immunophenotyping and chromosomal fluorescence in situ hybridization. *Blood* 94: 554-557.
- 10 20. Choolani M, O'Donoghue K, Talbert D, Kumar S, Roberts I, Letsky E, Bennett PR, Fisk NM. 2003. Characterization of first trimester foetal erythroblasts for non-invasive prenatal diagnosis. *Mol Human Reprod* 9: 227-235.
21. Coata G, Tilesi F, Fizzotti M, Lauro V, Pennacchi L, Tabilio A, Di Renzo GC. 2001. Prenatal diagnosis of genetic abnormalities using foetal CD34+ stem cells in maternal circulation and evidence they do not affect diagnosis in later pregnancies. *Stem Cells* 19: 534-542.
- 15 22. De la Chapelle A, Fantoni A, Marks P. 1969. Differentiation of mammalian somatic cells: DNA and hemoglobin synthesis in foetal mouse yolk sac erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 63: 812-819.
23. De la Chapelle A, Fantoni A, Marks PA. 1969. Differentiation of mammalian somatic cells: DNA and haemoglobin synthesis in foetal mouse yolk sac erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 63: 812-819.
- 20 24. Donoghue KO, Choolani M, Chan J, Fuente J, Kumar S, Campagnoli C, Bennett PR, Roberts IAG, Fisk NM. 2003. Identification of foetal mesenchymal stem cells in maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Mol Hum Reprod* 9: 497-502.
- 25 25. Ema M, Yokomizo T, Wakamatsu A, Terunuma T, Yamamoto M, Takahashi S. 2006. Primitive erythropoiesis from mesodermal precursors expressing VE-cadherin, PECAM-1, Tie2, endoglin, and CD34 in the mouse embryo. *Blood* 108: 4018-4024.
26. England SJ, McGrath KE, Frame JM, Palis J. 2010. Immature erythroblasts with extensive ex vivo self-renewal capacity emerge from the early mammalian fetus. *Blood*. doi:10.1182/blood-2010-07-299743
27. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. 2008. Noninvasive diagnosis of foetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 16266-16271.
- 30 28. Fraser ST, Isern J, Baron MH. 2007. Maturation and enucleation of primitive erythroblasts during mouse embryogenesis is accompanied by changes in cell surface antigen expression. *Blood* 109: 343-352.
29. Ganshirt-Ahlert D, Pohlschmidt M, Gal A, Miny P, Horst J, Holzgreve W. 1990. Ratio of foetal to maternal DNA is less than 1 in 5000 at different gestational ages in maternal blood. *Clin Genet* 38: 38-43.
- 35 30. Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, Gonzalez F, Rodriguez-Piza I, Vassena R, Raya A, Boué S, Barrero MJ, Corbella BA, Torrabadella M, Veiga A, Izpisua Belmonte JC. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell* 5: 353-357.
31. Goldberg JD, Wohlferd MM. 1997. Incidence and outcome of chromosomal mosaicism found at the time of chorionic villus sampling. *Am J Obstet Gynecol* 176: 1349-1352.
- 40 32. Grosset L, Barrelet V, Odartchenko N. 1974. Antenatal foetal sex determination from maternal blood during early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 120: 60-63.
33. Gussin HA, Bischoff FZ, Hoffman R, Elias S. 2002. Endothelial precursor cells in the peripheral blood of pregnant women. *J Soc Gynecol Investig* 9: 357-361.
- 45 34. Haase A, Olmer R, Schwanke K, Wunderlich S, Merkert S, Hess C, Zweigerdt R, Gruh I, Meyer J, Wagner S, Maier LS, Han DW, Glage S, Miller K, Fischer P, Schöler HR, Martin U. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell* 5: 434-441.
35. Han JY, Je GH, Kim IH, Rodgers GP. 1999. Culture of foetal erythroid cells from maternal blood using a twophase liquid system. *Am J Med Genet* 87: 84-85.
36. Han JY, Lee YH, Sin SD, Park JI, Kim IH, Je GH, Rodgers GP. 2001. Enrichment and detection of foetal erythroid cells from maternal peripheral blood using liquid culture. *Prenat Diagn* 21: 22-26.
- 50 37. Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, Creighton MP, Steine EJ, Cassady JP, Foreman R, Lengner CJ, Dausman JA, Jaenisch R. 2008. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133: 250-264.
38. Hanna J, Saha K, Pando B, van Zon J, Lengner CJ, Creighton MP, van Oudenaarden A, Jaenisch R. 2009. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 462: 595-601.
- 55 39. Hahn S, Zhong XY, Holzgreve W. 2008. Recent progress in non-invasive prenatal diagnosis. *Semin Foetal Neonatal Med* 13: 57-62.
40. Henderson KG, Shaw TE, Barrett IJ, Telenius AH, Wilson RD, Kalousek DK. 1996. Distribution of mosaicism in human placentae. *Hum Genet* 97: 650-654.
41. Henery CC, Kaufman MH. 1992. Relationship between cell size and nuclear volume in nucleated red blood cells of developmentally matched diploid and tetraploid mouse embryos. *J Exp Zool*. 261:472-478.
- 60 42. Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA. 2008. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature* 26: 1269-1275.
43. Huang Z, Fong C-Y, Gauthaman K, Sukumar P, Choolani M, Bongso A 2011. Novel Approaches to Manipulating Foetal Cells in the Maternal Circulation for Nn-Invasive Prenatal Diagnosis of the Unborn Child. *J. Cell. Biochem.* 112: 1475-1485.
- 65

44. Huber K, Bittner J, Worofka B, Rosen A, Hafner E, Philipp K, Bauer K. 2000. Quantitative FISH analysis and in vitro suspension cultures of erythroid cells from maternal peripheral blood for the isolation of foetal cells. *Prenat Diagn* 20: 479-486.
- 5 45. Jansen MW, Korver-Hakkennes K, van Leenen D, Brandenburg H, Wildschut, HI, Wladimiroff JW, Ploemacher RE. 2000. How useful is the in vitro expansion of foetal CD34+ progenitor cells from maternal blood samples for diagnostic purposes? *Prenat Diagn* 20: 725-731.
46. Ji P, Yeh V, Ramirez T, Murata-Hori M, Lodish HF. 2010. HDAC2 is required for chromatin condensation and subsequent enucleation of cultured mouse foetal erythroblasts. *Haematologica* 95: 2013-2021.
- 10 47. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. 2009. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell* 4: 472-476.
48. Kingsley PD, Malik J, Fantauzzo KA, Palis J. 2004. Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood* 104: 19-25. 49. Kiskinis E, Eggan K. 2010. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J. Clin. Invest.* 120: 51-59.
- 15 50. Kubli F, Hindermann P. 1966. Transabdominal amniocentesis and feto-maternal microtransfusion. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 26: 1244-1255.
51. 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. 1993. Risk evaluation of CVS. *Prenat Diagn* 13: 197-209.
- 20 52. Li Y, Di Naro E, Vitucci A, Zimmermann B, Holzgreve W, Hahn S. 2005. Detection of paternally inherited foetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA* 293: 843-849.
53. Li W, Ding S. 2010. Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Trends Pharmacol Sci* 31: 36-45.
- 25 54. Lin T, Ambasudhan R, Yuan X, Li W, Hilcove S, Abujarour R, Lin X, Hahm HS, Hao E, Hayek A, Ding S. 2009. A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods* 6: 805-808.
55. Little AT, Langlois S, Wilson D, Lansdorp PM. 1997. Frequency of foetal cells in sorted subpopulations of nucleated erythroid and CD34+ hematopoietic progenitor cells from maternal peripheral blood. *Blood* 89: 2347-2358.
- 30 56. Lo YM, Morey AL, Wainscoat JS, Fleming KA. 1994. Culture of foetal erythroid cells from maternal peripheral blood. *Lancet* 344: 264-265.
57. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. 1997. Presence of foetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350: 485-487.
- 35 58. Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, Zheng YW, Leung TY, Lau TK, Cantor CR, Chiu RW. 2010. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Science Transl Med* 2: 61.
59. Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, Kim K, Miller JD, Ng K, Daley GQ. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113: 5476-5479.
60. Lugus JJ, Park C, Ma YD, Choi K. 2009. Both primitive and definitive blood cells are derived from Flk-1+ mesoderm. *Blood* 113: 563-566.
- 40 61. Manotaya S, Elias S, Lewis DE, Simpson JL, Bischoff FZ. 2002. Evaluation of a culture system for enrichment of CD34+ hematopoietic progenitor cells present in maternal blood. *Foetal Diagn Ther* 17: 90-96.
62. Maximow AA. 1909. Untersuchungen über blut und bindegewebe 1. Die frühesten entwicklungsstadien der blut und binde- geweszellen beim saugtierembryo, bis zum anfang der blutbildung und der leber. *Arch Mikroskop Anat.* 73:444-561.
- 45 63. McGrath KE, Kingsley PD, Koniski AD, Porter RL, Bushnell TP, Palis J. 2008. Enucleation of primitive erythroid cells generates a transient population of "pyrenocytes" in the mammalian fetus. *Blood* 111: 2409-2417.
64. Muller F, Benattar C, Audibert F, Roussel N, Dreux S, Cuckle H. 2003. First-trimester screening for Down syndrome in France combining foetal nuchal translucency measurement and biochemical markers. *Prenat Diagn* 23: 833-836.
- 50 65. Okita K, Hong H, Takahashi K, Yamanaka S. 2010. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nature Protocols* 5: 418-428.
66. Palis J, Malik J, McGrath KE, Kingsley PD. 2010. Primitive erythropoiesis in the mammalian embryo. *Int. Jour. Dev. Biol* 54: 1011-1018.
67. Pereda J, Niimi G. 2008. Embryonic erythropoiesis in human yolk sac: two different compartments for two different processes. *Microsc. Res. Tech* 71: 856-862.
- 55 68. Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. 2000. Presence of foetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 46: 1832-1834.
69. Popova EY, Krauss SW, Short SA, Lee G, Villalobos J, Etzell J, Koury MJ, Ney PA, Chasis JA, Grigoryev SA. 2009. Chromatin condensation in terminally differentiating mouse erythroblasts does not involve special architectural proteins but depends on histone deacetylation. *Chromosome Res.* 17: 47-64.
- 60 70. Price JO, Elias S, Wachtel SS, Klinger K, Dockter M, Tharapel A, Shulman LP, Phillips OP, Meyers CM, Shook D, Simpson JL. 1991. Prenatal diagnosis with foetal cells isolated from maternal blood by multiparameter flow cytometry. *Am J Obstet Gynecol* 165: 1731- 1737.
71. Prieto B, Alonso R, Paz A, Cándenas M, Venta R, Ladenson JH, Alvarez FV. 2001. Optimization of nucleated red blood cells (NRBC) recovery from maternal blood collected using both layers of a double density gradient. *Prenat Diagn* 21: 187-193.
- 65

72. Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. 2000. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet* 356: 1170.
73. Samura O, Sekizawa A, Zhen DK, Falco VM, Bianchi DW. 2000. Comparison of foetal cell recovery from maternal blood using a high density gradient for the initial separation step: 1.090 versus 1.119 g/ml. *Prenat Diagn* 20: 281-286.
- 5 74. Sangiorgi F, Woods CM, Lazarides E. 1990. Vimentin downregulation is an inherent feature of murine erythropoiesis and occurs independently of lineage. *Development* 110: 85-96.
75. Sasaki K, Kendall MD. 1985. The morphology of the haemopoietic cells of the yolk sac in mice with particular reference to nucleolar changes. *J Anat.* 140: 279-295.
- 10 76. Schmorl CG. 1893. Pathologisch-Antomische Untersuchungen "uber Puerperal Eklampsie. [Pathological-anatomical explorations on puerperal eclampsia], Leipzig, Germany: Verlag FCW Vogel.
77. Schroder J, De la Chapelle A. 1972. Foetal lymphocytes in the maternal blood. *Blood* 39: 153- 162.
78. Staerk J, Dawlaty MM, Gao Q, Maetzel D, Hanna J, Sommer CA, Mostoslavsky G, Jaenisch R. 2010. Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 7: 20-24.
- 15 79. Steele MW, Breg WR. 1966. Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *The Lancet* 287: 383-385.
80. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872.
81. Tabor A, Vestergaard CH, Lidegaard Ø. 2009. Foetal loss rate after chorionic villus sampling and amniocentesis: an 11-year national registry study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 34: 19-24.
- 20 82. Troeger C, Holzgreve W, Hahn S. 1999. A comparison of different density gradients and antibodies for enrichment of foetal erythroblasts by MACS. *Prenat Diagn* 19: 521-526. Troeger C. et al. 1999. Approximately half of the erthrorblasts I maternal blood are of fetal origin. *Mol. Hum. Reprod.* 5: 1162-1165
83. Tutschek B, Reinhard J, Kögler G, Wernet P, Niederacher D. 2000. Clonal culture of foetal cells from maternal blood. *Lancet* 356: 1736-1737.
- 25 84. Valerio D, Aiello R, Altieri V, Malato AP, Fortunato A, Canazio A. 1996. Culture of foetal erythroid progenitor cells from maternal blood for non-invasive prenatal genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 16: 1073-1082.
85. Valerio D, Altieri V, Antonucci FR, Aiello R. 1997. Characterization of foetal hematopoietic progenitors circulating in maternal blood of seven aneuploid pregnancies. *Prenat Diagn* 17: 1159-1169.
86. Valerio D, Altieri V, Cavallo D, Aiello R, Antonucci FR. 2000. Detection of foetal trisomy 18 by short-term culture of maternal peripheral blood. *Am J Obstet Gynecol* 183: 222-225.
- 30 87. Van Handel B, Prashad SL, Hassanzadeh-Kiabi N, Huang A, Magnusson M, Atanassova B, Chen A, Hamalainen EI, Mikkola HK. 2010. The first trimester placenta is a site for terminal maturation of primitive erythroid cells. *Blood* 116: 3321-3330.
88. Voullaire L, Ioannou P, Nouri S, Williamson R. 2001. Foetal nucleated red blood cells from CVS washings: an aid to development of first trimester non-invasive prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 21: 827-834.
- 35 89. Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Tzetzis M, Malamis G, Kanavakis E. 2003. Rapid screening of multiple betaglobin gene mutations by real-time PCR on the Light Cycler: application to carrier screening and prenatal diagnosis of thalassemia syndromes. *Clin Chem* 49: 769-776.
90. Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. 1969. Practical and theoretical implications of foetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet* 1: 1119-1122.
- 40 91. Weise M, Gabriel D, Tanner B. 1984. Growth behavior of amnion cell cultures. *Zentralbl Allg Pathol* 129: 499-505.
92. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A. 2009. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458: 766-770.
- 45 93. Yakobov E, Rechavi G, Rozenblatt S, Givol D. 2010. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 394: 189-193.
94. Ye L, Chang JC, Lin C, Sun X, Yu J, Kan YW. 2010. Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 9826-9830.
- 50 95. Yoshida H, Kawane K, Koike M, Mori Y, Uchiyama Y, Nagata S. 2005. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* 437: 754-758.
96. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920.
- 55 97. Zimmermann B, Holzgreve W, Zhong XY, Hahn S. 2002. Inability to clonally expand foetal progenitors from maternal blood. *Foetal Diagn Ther* 17: 97-100.
98. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell stem cell* 4: 381-384.
- 60 99. Zhu S, Li W, Zhou H, Wei W, Ambasadhan R, Lin T, Kim J, Zhang K, Ding S. 2010. Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell stem cell* 7: 651-655.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar al menos un eritroblasto fetal primitivo humano en una muestra, comprendiendo el método

- 5
- (i) proporcionar al menos una célula nucleada CD45 negativa a partir de la muestra; y
  - (ii) analizar la morfología de dicha al menos una célula nucleada CD45 negativa por tinción del núcleo y determinar la relación entre el citoplasma y el núcleo, según el área, de dicha al menos una célula con el núcleo teñido de la muestra, en donde si la al menos una célula CD45 negativa tiene una relación entre el citoplasma y el núcleo, según el área, en el intervalo de 16:1 a 9:1 y al menos una de las características seleccionadas entre
- 10
- a. tener un diámetro de célula dentro del intervalo de 10-20  $\mu\text{m}$ ;
  - b. no ser adherente a una superficie celular no pegajosa lisa;
  - c. ser maleable; y/o
  - 15 d. ser de forma globular,

la al menos una célula CD45 negativa se identifica como un eritroblasto fetal primitivo humano, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre materna, sangre del cordón umbilical, líquido amniótico, muestra de vellosidades coriónicas, sangre fetal y tejido fetal, y en donde el eritroblasto fetal primitivo humano identificado se puede cultivar.

20

2. Un método para cultivar al menos un eritroblasto fetal primitivo humano a partir de una muestra, comprendiendo dicho método:

- 25
- (i) identificar al menos un eritroblasto fetal primitivo humano de acuerdo con el método de la reivindicación 1;
  - (ii) aislar el al menos un eritroblasto fetal humano identificado en (i) utilizando un micromanipulador;
  - y
  - (iii) cultivar el al menos un eritroblasto fetal humano aislado en (ii) en un medio que comprende IMDM (medio de Dulbecco modificado con Iscove), un 30 % de FBS (suero bovino fetal), un 1 % de BSA (albúmina de suero bovino),  $10^{-4}$  moles/l  $\beta$ -mercaptoetanol, 100  $\mu\text{g/ml}$  de transferrina saturada con hierro.
- 30

3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el método se lleva a cabo en condiciones normóxicas.

35

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en donde el eritroblasto fetal se mantiene en una microgota.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la microgota está recubierta de al menos un aceite mineral.

40

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde el medio es capaz de aumentar la viabilidad del eritroblasto fetal.

7- El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde el medio es capaz de mantener la viabilidad celular del eritroblasto fetal durante al menos 48 horas.

45

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el medio de cultivo comprende al menos un mitógeno y/o al menos un factor epigenético, en donde el mitógeno se selecciona del grupo que consiste en concanavalina A, fitohemaglutinina, lipopolisacárido (LPS), factores de crecimiento de tipo insulina (IGF) y mitógeno pokeweed y/o el al menos un factor epigenético es al menos un inhibidor de histona deacetilasa y/o al menos un inhibidor de ADN metil transferasa.

50

9. Un método de diagnóstico de al menos un trastorno prenatal en un feto, comprendiendo el método:

- 55
- i. cultivar al menos un eritroblasto fetal primitivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8;
  - ii. determinar al menos un marcador genético asociado al trastorno prenatal en el eritroblasto fetal; en donde el método es *in vitro*.

60

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el trastorno prenatal se selecciona del grupo que consiste en síndrome de Down, síndrome de Edwards, síndrome de Patau, un defecto del tubo neural, espina bífida, paladar hendido, enfermedad de Tay Sachs, anemia de células falciformes, talasemia, fibrosis quística, síndrome de X frágil, atrofia muscular espinal, distrofia miotónica, enfermedad de Huntington, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, hemofilia, distrofia muscular de Duchenne, trastorno mitocondrial, exostosis múltiple hereditaria y trastorno de osteogénesis imperfecta.

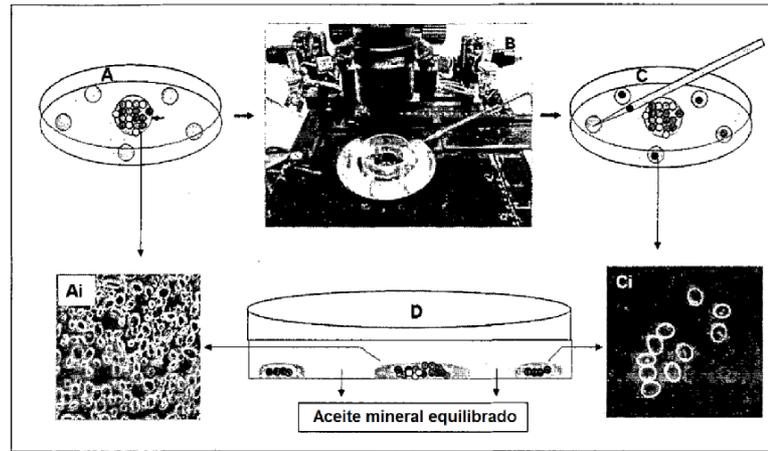


FIGURA 1

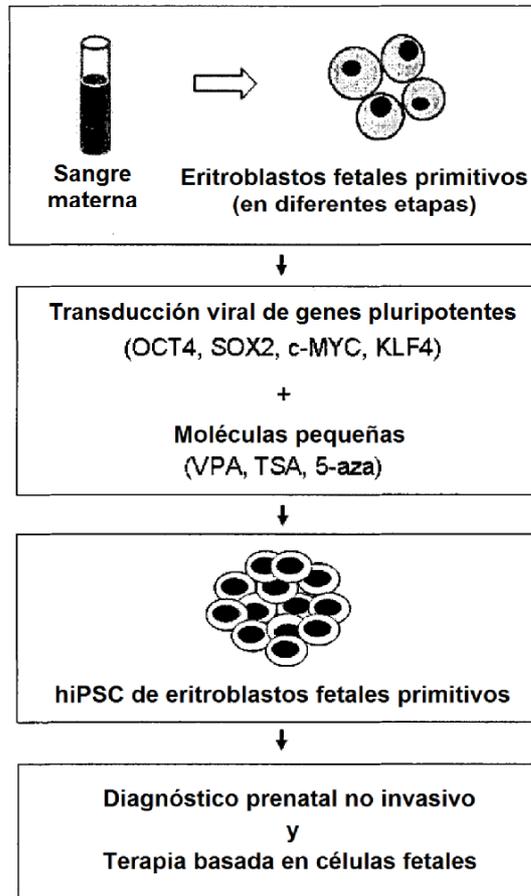


FIGURA 2

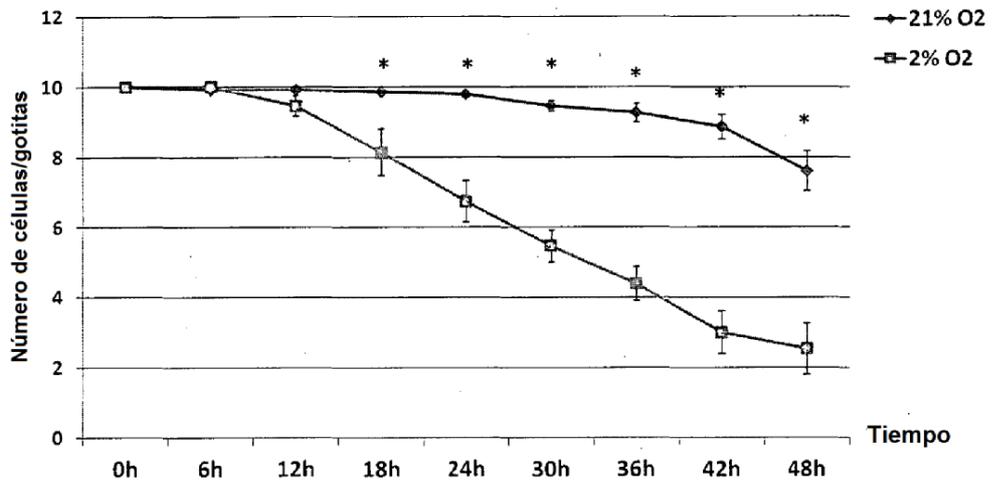


FIGURA 3

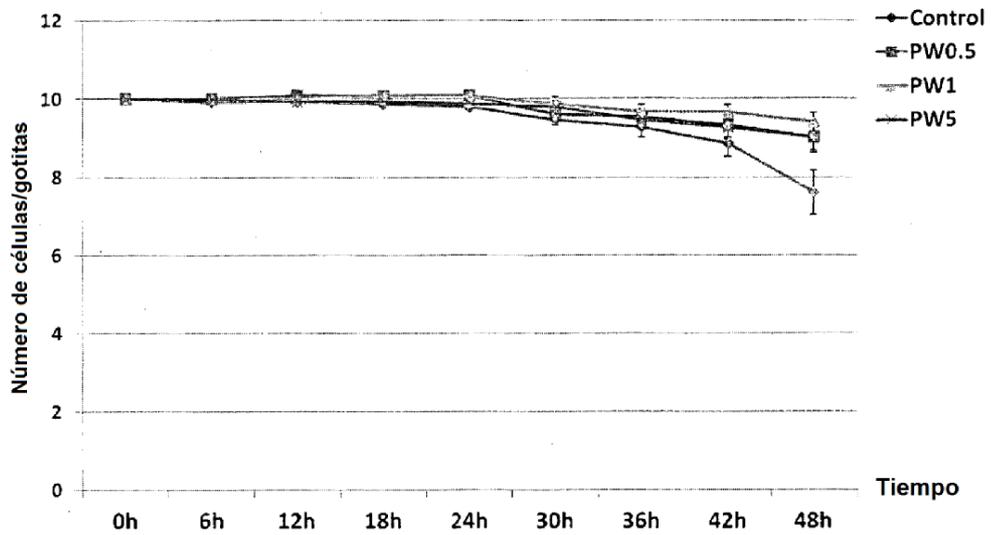


FIGURA 4

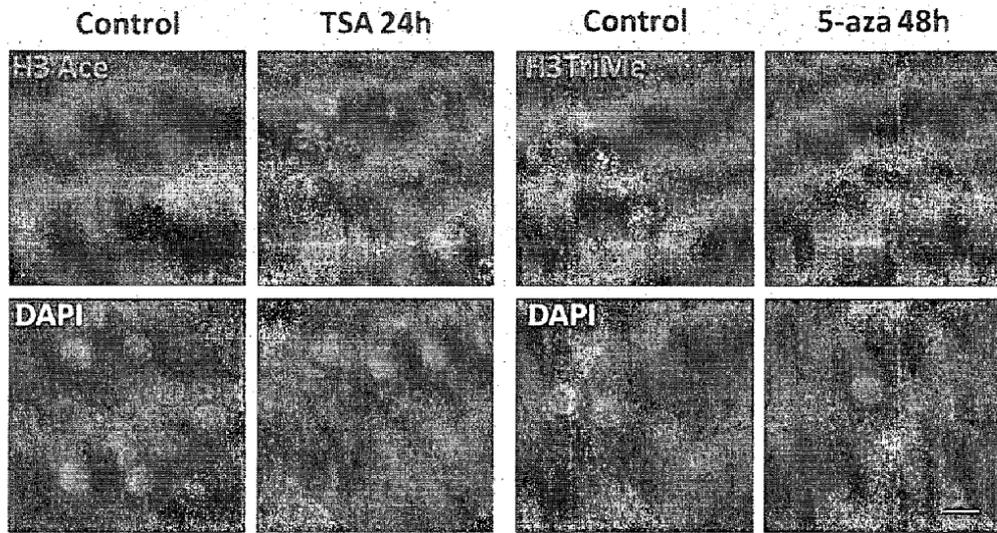


FIGURA 5

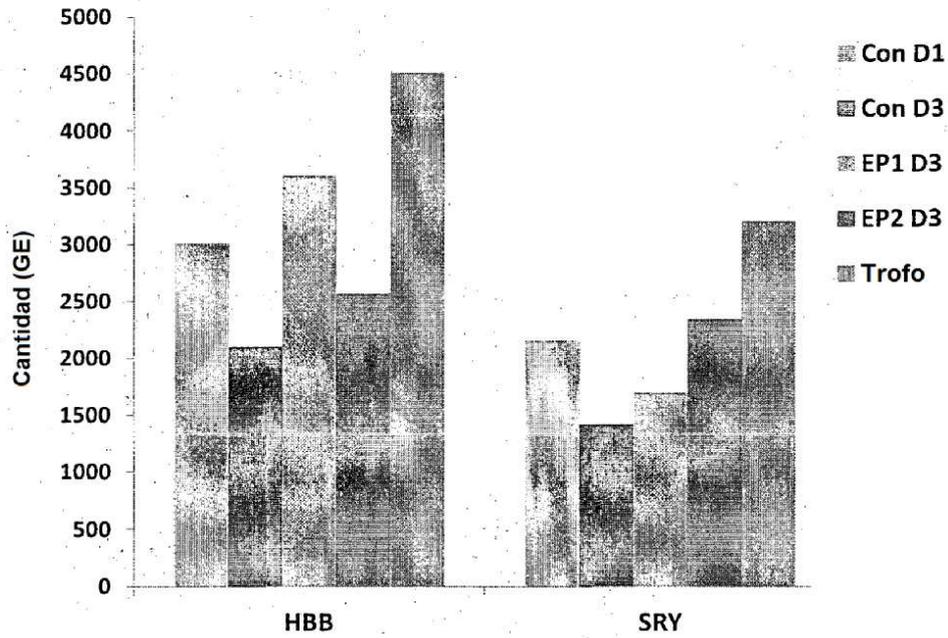


FIGURA 6