

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 182**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6888 (2008.01)

C12N 5/073 (2010.01)

C12Q 1/24 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2013 PCT/US2013/065570**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2014 WO14062995**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2013 E 13847056 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2909315**

54 Título: **Identificación y análisis de células de trofoblastos fetales en mucus cervical para diagnóstico prenatal**

30 Prioridad:
19.10.2012 US 201261715854 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.10.2019

73 Titular/es:
**WAYNE STATE UNIVERSITY (100.0%)
5057 Woodward Ave, Suite 6306
Detroit, MI 48202, US**

72 Inventor/es:
**ARMANT, D., RANDALL y
DIAMOND, MICHAEL P.**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 729 182 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

Identificación y análisis de células de trofoblastos fetales en mucus cervical para diagnóstico prenatal

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a aislamiento de células. Más específicamente, la presente invención se refiere a métodos no invasivos de recogida y aislamiento de células.

2. Descripción de la técnica relacionada.

10 Se cree que debido a cambios demográficos, mayor exposición a toxinas ambientales e intervención en el proceso reproductivo, pueden estar aumentando anomalías de desarrollo. Se ha estimado que el riesgo de toda pareja embarazada de tener un bebé nacido vivo con anomalías cromosómicas o defectos estructurales puede ser entre 3 y 5%. Debido a este considerable riesgo, en las últimas décadas se han realizado muchos esfuerzos para identificar embarazos con riesgos de anomalías cromosómicas y trastornos genéticos al comienzo de la gestación. El estándar actual de cuidados implica estudiar análisis maternos y marcadores ultrasónicos, solos o combinados, para identificar embarazos con riesgos, seguido de referencias a ensayos definitivos de diagnóstico que incluyen amniocentesis y muestreo veloso coriónico. Aunque estas últimas modalidades tienen índices considerables de positivos falsos y negativos falsos, los últimos ensayos diagnósticos son invasivos y conllevan riesgos significativos de pérdida fetal. En realidad, Mujzinovic et al. realizaron un análisis sistemático de 45 estudios e informaron un índice de pérdida fetal de 1,9% en el caso de amniocentesis y 2% en el caso de muestreo veloso coriónico. Por lo tanto, se necesita real y desesperadamente desarrollar métodos más seguros de obtener material genético del feto.

20 Otra alternativa para una diagnosis prenatal es diagnosis genética de preimplantación (PGD), que implica examen de anomalías cromosómicas o trastornos de genes individuales en un embrión antes de la implantación. La ventaja principal es evitar el final electivo del embarazo, que ofrece al mismo tiempo una alta probabilidad de que el feto esté exento de un trastorno específico. Aunque la PGD es un método atractivo de diagnosis prenatal, es un auxiliar de tecnología reproductiva asistida que requiere fertilización *in vitro*, que tiene sus propios riesgos y costes altos. Por lo tanto, la PGD no es viable como herramienta diagnóstica universal de anomalías genéticas en la población general.

30 Se ha intentado la identificación de células fetales en suero materno pero este enfoque ha sido obstaculizado por la relativa rareza de células fetales en sangre materna (1 célula fetal por 10^6 - 10^7 células maternas) y por dificultades asociadas a su aislamiento y análisis. En general, ha sido decepcionante la eficacia clínica proyectada. No obstante, el descubrimiento reciente de ácidos nucleicos en plasma materno ha introducido nuevas posibilidades para un examen prenatal no invasivo de aneuploidias cromosómicas. Se manifiestan anomalías después de las diez primeras semanas de gestación midiendo la relación alélica de polimorfismos de nucleótidos simples en la región codificadora del genoma humano, análisis de fragmentos de DNA con diferentes modelos de metilación del DNA entre DNA fetal y materno, enriquecimiento de la concentración fraccionaria de DNA fetal en plasma materno usando métodos físicos o químicos y el desarrollo de métodos digitales más exactos de análisis de ácidos nucleicos fetales basados en la reacción en cadena con polimerasa (PCR) para el análisis de ácidos nucleicos fetales. Se podrían diagnosticar con DNA fetal enfermedades transmisibles específicas pero, debido a la naturaleza fragmentada de DNA fetal exento de células libres circulantes, no se considera un enfoque fiable el examen del plasma materno.

40 Antes de 13-15 semanas de gestación, se cree que pequeñas zonas de erosiones permiten a los trofoblastos cruzar la decidua capsular y alcanzar la cavidad uterina. Este proceso es menos probable después de que la membrana amniocoriónica selle la cavidad uterina y el orificio cervical interno, Este proceso es menos probable después de que la membrana amniocoriónica selle la cavidad uterina y el orificio cervical interno, que se cree se produce a los tres meses de gestación. En 1971, Shettles sugirió que durante un embarazo prematuro se produce en la cavidad uterina un derramamiento similar haciendo disponibles en el canal endocervical elementos celulares coriónicos procedentes de los vellos degenerantes. La posibilidad de captar células fetales procedentes de regiones accesibles del tracto reproductor sugiere nuevas propuestas para una diagnosis prenatal prematura. El aislamiento de células fetales procedentes del cérvix y la cavidad endometrial ofrece una alternativa atractiva no invasiva para una diagnosis muy prematura (6-14 semanas, posiblemente tan prematura como 5 semanas). Desde su primera descripción, varios investigadores han indicado la posibilidad de aislar células fetales del mucus cervical o de fluido obtenido por lavado de la cavidad endometrial con grados de éxito variables. La bibliografía actual sugiere que el presente estatus de muestreo de células transcervicales (TCC) en diagnosis prenatal es experimental pero conlleva excelente potencial para la diagnosis genética y predicción de resultados de embarazos como métodos de laboratorio.

55 El método ideal que daría fiablemente células fetales en cantidad apreciable no debe tener impacto negativo sobre embarazos en curso y debe estar exento de complicaciones infecciosas o traumáticas. También debe ser sencillo de realizar con coste eficaz y con variabilidad mínima entre observadores. Se ha ideado una serie de técnicas para recoger muestras de TCC del canal endocervical y de la cavidad endometrial, incluidos frotis obtenidos con escobillas

de algodón o con cepillos citológicos, aspiración de mucus cervical con un catéter, biopsia endometrial con un Pipelle y lavado del canal endocervical o de la cavidad uterina, todos ellos con niveles de éxito variables.

En la actualidad, la bibliografía existente difiere mucho y frecuentemente es contradictoria en proyectar la eficacia relativa de los métodos actualmente disponibles para recoger células fetales. Anteriormente se había enfatizado sobre la viabilidad de obtener células fetales y fijar su utilidad diagnóstica, en lugar de una comparación directa de la eficacia relativa de los diversos métodos en ensayos aleatorios de control, como se ha publicado recientemente. Se ha indicado que el procesamiento de las muestras de TCC después de recogerlas tiene una variación enorme de un estudio a otro, que afecta directamente a la utilidad de la información. Las técnicas usadas para identificar las células fetales y los puntos finales de diagnóstico (sexo del feto versus trastornos de genes) también son diferentes, dando grupos heterogéneos de comparación con resultados no uniformes. Por lo tanto, hay una falta de información sobre técnicas bien descritas para la recogida y análisis de muestras, que origina una dependencia considerable sobre la técnica y habilidad de operarios individuales.

Por ejemplo, en la referencia 1971 publicada por Shettles, se usó la identificación del cromosoma Y para determinar el sexo del feto a partir de muestras de mucus cervical obtenidas con escobillas de algodón. Una limitación del uso de escobillas de algodón para recuperar muestras de TTC es el atrapamiento de células en el algodón, que puede reducir el rendimiento. El uso de un cepillo citológico para la recuperación o lavado de mucus cervical del canal endocervical con solución salina normal ofrece alternativas variables para la recogida de células transcervicales. Un cepillo citológico insertado a través del orificio externo hasta una profundidad máxima de 2 cm y girado por lo menos una vuelta completa durante la separación proporciona células fetales en cantidades diagnósticas. Sin embargo, otros investigadores no reprodujeron este éxito. La aspiración del mucus endocervical con una cánula simple también origina la detección de células fetales en una cantidad de hasta 70% de muestras de TCC de madres con fetos masculinos. Además, Kingdom et al. demostraron que el lavado del canal endocervical recupera más células de trofoblastos que el cepillo citológico y que las muestras obtenidas con cepillos citológicos pueden tener una incidencia mayor de desechos y células endocervicales maternas. Un método más eficaz en cuanto a rendimiento de células fetales es un lavado intrauterino (IUL) en el que se usa un catéter flexible conectado a una jeringa llena con solución salina normal para lavar la cavidad endometrial. El lavado intrauterino y los otros métodos de toma de muestras de células transcervicales (TCC) se ilustran en un artículo de Adinolfi y Sherlock.

El antígeno leucocítico humano (HLA)-G es una proteína compleja de histocompatibilidad de clase Ib que es expresada por células de trofoblastos citológicos extravellosos humanos y que no existe en todas las otras poblaciones de células uterinas y placentarias. En 2003, Bulmer et al. emplearon MABs frente a HLA-G para identificar células de trofoblastos citológicos en muestras de células transcervicales recogidas por lavado intrauterino. Las células de trofoblastos citológicos caracterizadas por sus núcleos hiper cromáticos irregulares grandes eran HLA-G positivas y fueron identificadas en 12 de 23 (52%) muestras de células transcervicales. Interesantemente, el examen molecular de DNA por QF-PCR en elementos HLA-G positivos recogidos por microdissección de captura láser de cuatro de las pacientes reveló marcadores fetales, demostrando la utilidad de este enfoque para una diagnosis genética prenatal. El enfoque histoquímico inmunológico y molecular combinado usado en este estudio reveló una variación considerable entre las muestras. La sensibilidad del marcador MAB fue relativamente baja incluso aunque la reactividad de del HLA.G proporcione alta especificidad para la identificación de células de trofoblastos obtenidas de fetos. El HLA-G es expresado por elementos celulares de trofoblastos citológicos extravellosos, pero no por fragmentos sincitiales, limitando su capacidad de identificar todas las células fetales. La necesidad de que un conjunto de MABs reaccione exclusivamente contra antígenos expresados sobre subpoblaciones específicas de células de trofoblastos podría ser crucial para un enfoque histoquímico inmunológico para identificar en general células fetales. Más recientemente, se demostró que se podrían identificar firmemente (>95% de muestras) células de trofoblastos citológicos extravellosos usando HLA-G como marcador antigénico en muestras de células transcervicales recogidas por una escobilla citológica en un enjuague fijador y preparadas sobre portaobjetos de microscopio exentos de mucus interferente. Portaobjetos teñidos con el mismo anticuerpo contra HLA-G usados por Bulmer et al. y teñidos de nuevo con hematoxilina revelaron un número pequeño de células de trofoblastos marcadas con anticuerpos sobre un fondo denso de núcleos de células cervicales. La frecuencia de los trofoblastos fue aproximadamente uno en dos mil en todos los embarazos muestreados exitosamente entre seis y catorce semanas de gestación, aunque este valor se redujo cuatro a cinco veces en muestras recogidas de mujeres con embarazo ectópico u óvulo frustrado. Estos descubrimientos sugieren que, además de ensayos genéticos, se puede obtener información a partir de análisis de células transcervicales que alerten a los médicos sobre embarazos con riesgos.

La recuperación y análisis de células fetales recogidas de la placenta en el canal endocervical podría proporcionar una mayor disponibilidad de diagnósticos genéticos prenatales en la población general de pacientes. Con mejoras en la eficacia y seguridad de la recogida de trofoblastos por muestreo de TCC usando la escobilla citológica, y mejoras en la identificación y aislamiento de células que expresan marcadores de trofoblastos, se podrían obtener fácilmente cantidades pequeñas de DNA fetal para ensayos genéticos. Nuevas tecnologías sensibles, como actualmente en desarrollo para análisis de DNA fetal en suero materno, podrían dar una amplia información sobre el genoma fetal a partir de números moderados de células aisladas. La capacidad de proporcionar células de trofoblastos citológicos por TCC tan pronto como a las seis semanas de gestación podría hacer disponible esta información vital mucho antes que tecnologías actuales, incluido el análisis de DNA fetal de suero materno. Por lo tanto, podría ser útil desarrollar un método no invasivo para trofoblastos aislados.

Katz-Jafe et al. (2005; BJOG, 112: 595-600) y el documento US 2005/123914 se refieren a un método no invasivo para aislar células fetales para la diagnosis genética usando análisis histoquímico inmunológico en micromanipulación/microdissección de células particulares.

5 El documento US 2007//0224597 se refiere a un método de aislar y purificar células de trofoblastos fetales procedentes de una muestra de mucus obtenida de una mujer embarazada, células que se analizan usando FISH [(FISH = fluorescent hybridization *in situ* (hibridación fluorescente *in situ*)].

Imudia et al. (2009, Human Reproduction, 24: 2.086-2.092) se refiere a un método para recoger células de trofoblastos del canal cervical y posterior análisis histoquímico inmunológico.

10 El documento US 2004/0197832 se refiere a un método de diagnosis genética prenatal no invasiva usando células transcervicales de una mujer embarazada, células que se analizan usando FISH.

El documento US 2005/0181429 se refiere a un método de diagnosis general prenatal no invasiva usando células transcervicales de una mujer embarazada, células que se analizan por tinción inmunogénica y FISH.

Huang et al. (2006; J. Sound Med. Univ., 24: 1.571-1.573) se refieren a un método de obtener células fetales de células transcervicales de una mujer embarazada, que se analizan usando química citológica inmunológica y microscopía.

15 **Resumen de la invención**

Según la presente invención, se proporciona un método de recoger células fetales de una muestra endocervical, método que comprende las etapas de separar mucus de la muestra endocervical con lo que se disocian células fetales de células maternas en la muestra endocervical usando marcado magnético inmunológico de las células fetales en suspensión.

20 Las células disociadas preparadas por método antes citado pueden ser analizadas y usadas para una diversa de fines, incluidos, pero sin carácter limitativo, la determinación de células fetales entre células cervicales, determinación de la densidad de células fetales para predecir embarazos de alto riesgo, análisis genético de células fetales y determinación del factor de desarrollo u otra expresión de marcadores biológicos para predecir trastornos obstétricos, incluida la preeclampsia.

25 Por lo tanto, la presente invención incluye un método de detectar preeclampsia o restricción del desarrollo intrauterino en una mujer embarazada, método que comprende las etapas de obtener células de trofoblastos fetales extravellosos aislados preparados usando el método según la presente invención, en donde las células de trofoblastos extravellosos son de muestras para el test de Papanicolau recogidas a las 5-20 semanas de gestación; y ensayando las células de trofoblastos fetales extravellosos aislados con un anticuerpo contra una proteína fetal seleccionada de galectina 13, galectina 14, factor de desarrollo placentario, proteína plasmática A asociada al embarazo, proteína fetal alfa, endoglina y tirosina-quinasa 1 relacionada con fms, en donde una cantidad menor de galectina 13, galectina 14, factor de desarrollo placentario y proteína plasmática A asociada al embarazo y una cantidad mayor de proteína fetal alfa, endoglina y tirosina-quinasa 1 relacionada con fms son indicativas de preeclampsia o restricción del desarrollo intrauterino.

35 **Breve descripción de los dibujos**

Otras ventajas de la presente invención serán fácilmente apreciadas cuando sea mejor comprendida por referencia a la siguiente descripción cuando se considere en relación con los dibujos adjuntos en los que:

40 La figura 1 muestra células aisladas de TCS que expresan β -hCG. Se representó cada campo para mostrar la fluorescencia de tinción nuclear DAPI (izquierda) o anticuerpo secundario (derecha). Todas las células en la fracción unida fueron marcadas por anti- β -hCG, indicado por las cabezas de las flechas en imágenes emparejadas de DAPI y hCG, aunque ninguna de las células no unidas fuer marcadas. Las células unidas marcadas con IgG no inmune tampoco eran fluorescentes, lo cual indica una unión específica baja.

45 La figura 2 muestra la determinación del sexo con células de trofoblastos aislados. El análisis de PCR (reacción en cadena con polimerasa) de genes en los cromosomas X (DMD) e Y (SRY) usando DNA aislado de células de fibroblastos (Fb) del prepucio células Fb individuales fijadas o diez células de trofoblastos individuales aislados, usando cebadores sólo para SRY, sólo para DM o para ambos genes en un ensayo múltiple. El feto de la paciente en el gel superior es masculino mientras que el gel inferior indica un feto femenino. Algunas de las reacciones en la muestra inferior fallaron, lo más probablemente debida a pérdida de la célula durante la transferencia al tubo de la PCR.

Descripción de las realizaciones preferidas

50 La presente invención proporciona un método de obtener y usar material fetal obtenido en gran cantidad durante el primer trimestre de embarazo del cérvix o de la cavidad uterina para realizar una diagnosis prenatal. El método incluye disociar las células fetales y células maternas del mucus de una muestra y aislar de otras células en una muestra endocervical las células fetales disociadas. Adicionalmente, los métodos de la presente invención permiten la

adquisición no invasiva de células EVT y la comparación de niveles de expresión de proteínas con resultados de embarazos. Estos descubrimientos identificaron un grupo sólido de marcadores biológicos de EVT que podrían informar durante el primer y segundo trimestre sobre riesgos de una paciente de padecer PE o IUGR u otros trastornos obstétricos. Los métodos de la presente invención se pueden usar como servicio de un laboratorio clínico. El método incluye las etapas de recoger células, colocar en una solución fijadora las células recogidas, separar el mucus por acidificación, lavar por centrifugación las células remanentes y preparar las células sobre portaobjetos de un microscopio.

Las muestras se pueden obtener usando métodos estándar no invasivos conocidos por los expertos en la materia. Ejemplos incluyen, pero sin carácter limitativo, lavado intrauterino, separación de mucus cervical o separación de tejido de la superficie del orificio cervical o del canal endocervical. El método preferido es recoger mucus del canal endocervical usando un cepillo citológico insertado pasados 2 cm el orificio externo y girando para separar y captar el tapón de mucus erosionando mínimamente el tejido cervical. El cepillo citológico se lava después en una solución fijadora compuesta de un alcohol y un tampón de pH bajo (4-6). Por ejemplo, se puede usar una mezcla estándar de 3% de ácido acético, 7% de acetato sódico y 50% de metanol. Los médicos pueden ser instruidos sobre cómo recoger muestras usando el estuche ThinPrep® en mujeres que se encuentran en el primer o segundo trimestre de embarazo. Este estuche contiene un cepillo citológico e incluye 20 ml de solución fijadora.

Las células recogidas se aíslan del mucus por acidificación. La acidificación se puede realizar por métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, adición de una solución de ácido acético del 3% para reducir el pH de la solución fijadora que contiene células a un valor de 2 a 4, que corresponde a una dilución de la solución de ácido acético de 10 a 20 veces en la solución fijadora.

Una vez obtenida la muestra, en las muestras recogidas se pueden aislar e identificar células fetales u otros tipos de células de importancia clínica, como subtipos de células inmunológicas. Esto se puede realizar usando métodos conocidos por los expertos en la materia, incluidos, pero sin carácter limitativo, uso de la evidencia de la presencia del cromosoma masculino Y, comparación del perfil alélico con perfil alélico materno y expresión de moléculas marcadoras de trofoblastos (por ejemplo, citoqueratina 7, hCG, HLA-G, fosfatasa alcalina placentaria, ácido hialurónico terminado por anticuerpo monoclonal NDOG1 y el objetivo no conocido de anticuerpo monoclonal FT141.1, a.k.a, FT1.41.1). En la mayoría de los casos, el análisis de células fetales podría implicar diagnóstico genético por hibridación fluorescente *in situ* (FISH) o reacción en cadena con polimerasa (PCR). Los métodos se pueden usar para predecir embarazos basándose en los ensayos realizados en las células recogidas usando el estuche ThinPrep®.

Los inconvenientes principales del muestreo de células fetales depositadas en el tapón de mucus cervical son que están presente muchas más células maternas que células fetales y que el mucus interfiere muchos ensayos debido a agregación de células y fluorescencia del fondo del mucus. El primer problema se puede solventar usando marcadores fluorescentes sólidos para células de trofoblastos. Una limitación del uso de HLA-G como marcador es que no reconoce todas las subpoblaciones de trofoblastos (por ejemplo, fragmentos de trofoblastos sincitiales). La citoqueratina es expresada por todas las subpoblaciones de trofoblastos, pero también se puede encontrar en algunos tipos de células maternas, originando positivos falsos. El problema del mucus ha sido solventado disolviéndolo por acidificación. El número de trofoblastos presentes en las muestras, que puede variar, puede limitar el método. Si el número es demasiado bajo, podría no ser practicable la citometría de flujo. Sin embargo, la microscopía de fluorescencia inmunológica podría ser una solución viable siempre que varas células HLA-G positivas se puedan colocar en un campo microscópico preparado de hasta 1 ml de muestra.

La recuperación y análisis de células fetales vertidas desde la placenta al canal cervical proporciona mayor disponibilidad de diagnóstico genético a la población general de paciente. Con mejoras en la eficacia y seguridad de la recogida de trofoblastos por muestreo de TCC usando el cepillo citológico y en la identificación de células que expresan marcadores de trofoblastos, se pueden obtener fácilmente cantidades pequeñas de DNA fetal para ensayos genéticos. Nuevas tecnologías sensibles, como las actualmente en desarrollo para análisis de DNA fetal en suero materno, podrán dar amplia información sobre el genoma fetal a partir de números moderados de células aisladas. La capacidad de proporcionar células de trofoblastos citológicos por TCC tan pronto como a las seis semanas de gestación podría hacer disponible esta información vital mucho antes que tecnologías actuales, incluido el análisis de DNA fetal en suero materno. Dentro de unos pocos años, se espera realizar más estudios usando muestreo de TCC para la diagnosis prenatal de anomalías cromosómicas, ensayos de paternidad, examen de embarazos anormales en el primer trimestre y diagnosis prematura de problemas obstétricos, todos los cuales se podrían realizar usando las células aisladas por los métodos descritos en la presente memoria.

Adicionalmente, un embarazo ectópico complica aproximadamente 1-2% de todos los embarazos y se produce cuando el trofoblasto en desarrollo se implanta en un sitio distinto del fondo de la cavidad uterina, lo más comúnmente en la trompa de Falopio. Una diagnosis clínica retardada de esta anomalía puede originar consecuencias maternas lamentables. La presencia d células de trofoblastos en el canal cervical durante el primer trimestre proporciona una solución no invasiva de predecir embarazos mediante muestreo transcervical.

En la presente realización se usa un estuche disponible comercialmente (ThinPrep®, Hologic Corporation, Marlborough, MA) para recoger del cérvix células durante el primer trimestre del embarazo. Esto es mínimamente invasivo ya que el test de Papanicolau es recomendado rutinariamente durante el embarazo. Usando el estuche

ThinPrep[®], se usa un cepillo citológico para recoger mucus y material celular del cérvix entre el orificio interior y el orificio exterior, según recomienda el fabricante. Las células recogidas se lavan en medio de transporte PreservCyt[®] suministrado por el fabricante en un vial. El medio de transporte PreservCyt[®] contiene una solución fijadora a base de metanol- ácido acético. Las muestras se guardan a temperatura ambiente o bajo refrigeración hasta su análisis.

5 La preparación del portaobjetos para la tinción histoquímica inmunológica se puede hacer acidificando primero la muestra para disolver mucus y células libres atrapadas. La muestra se coloca después en un embudo Shandon EZ fijado al portaobjetos de un microscopio y se centrifuga en una centrifugadora Cytospin 3. Este procedimiento da células extendidas uniformemente en una zona delimitada del portaobjetos y exenta de mucus que pudiera interferir. Alternativamente, para la preparación de portaobjetos citológicos se puede usar un procesador automatizado. Un ejemplo es el ThinPrep2000 (Hologic).

10 Las células se tiñen después con anticuerpo contra HLA-G, una proteína importante de compatibilidad histológica expresada sólo por células de trofoblastos fetales. Se pueden usar otros marcadores de trofoblastos, por ejemplo, la subunidad β de gonadotropina coriónica (β -CG) o lactógeno placentario (PL), entre otros, pero algunos (por ejemplo, la queratina citológica 7) son menos específicos. Para identificar las células de trofoblastos marcadas fluorescentemente se usa microscopía de fluorescencia inmunológica o citometría de flujo. Se puede requerir una proteína de interés en las células HLA-G positivas usando un anticuerpo apropiado y un anticuerpo secundario con un nivel marcado fluorescente diferente (marcado doble). Alternativamente, se puede usar un procedimiento FISH para el análisis genético de las células HLA-G positivas, por ejemplo, para detectar el número de cromosomas una secuencia particular de genes si hubiera una forma de identificar las células fetales, como la presencia del cromosoma Y. Sin embargo, podría ser necesaria una estrategia diferente en el caso de un feto femenino. Se ha demostrado (Imudia et al., 2009) que es posible usar un anticuerpo secundario ligado a una enzima para la identificación de HLA-G que se puede visualizar por microscopía de campo brillante (por ejemplo, con diaminobencidina como sustrato para un marcado de identificación de peroxidasa) y se podrían aislar las células de interés mediante disección microscópica de captura láser para el análisis genético por PCR.

25 Se ha encontrado que placentas de mujeres con el trastorno hipertensivo de la preeclampsia han alterado la expresión de varias proteínas [factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor a de crecimiento transformador (TGFA), factor de crecimiento análogo al EGF de unión a la heparina (HBEGF)]. Por lo tanto, el método de marcado fluorescente doble se puede usar para estudiar la expresión de estas proteínas en trofoblastos cervicales aislados recogidos durante el primer trimestre, meses antes de que se presente cualquier síntoma. Por lo tanto, este método podría proporcionar una herramienta de diagnóstico para identificar mujeres con riesgo de desarrollar más tarde preeclampsia durante su embarazo.

30 Actualmente, se puede usar muestreo veloso coriónico (CVS) o amniocentesis para diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas fetales. Ambos métodos son invasivos y se asocian a una pérdida potencial del embarazo. El CVS sólo se puede realizar después de 10 semanas y la amniocentesis se ha de realizar después de 14 semanas de gestación. Es mucho menos deseable el término del embarazo después del inicio del segundo trimestre. Los métodos de la presente invención permiten realizar el ensayo al principio del primer trimestre y de una manera no invasiva.

40 En otra realización, se pueden usar los métodos para ensayar la expresión de marcadores biológicos que son indicativos de trastornos obstétricos. Los marcadores biológicos pueden incluir hormonas del crecimiento, proteínas y RNA. A modo de ejemplo, los métodos se pueden usar para ensayar la expresión de proteínas por células de doble marcado con anticuerpos fluorescentes para determinar si el EGF, TGFA o HBEGF se reducen en células de trofoblastos. Se han observado estos cambios en células de trofoblastos de placentas obtenidas de mujeres con preeclampsia. Como el 5% de todas las mujeres embarazadas desarrollan con el tiempo preeclampsia, podría ser beneficioso realizar este ensayo rutinariamente cuando se confirme el embarazo. Las mujeres con riesgo de padecer este trastorno podrían ser instruidas para tomar precauciones contra el desarrollo de hipertensión mucho antes de que aparezcan los primeros síntomas clínicos.

50 En otra realización, el método puede incluir realizar ensayos genéticos de células de trofoblastos transcervicales. Se puede obtener DNA de trofoblastos (1) por microscopía de captura láser de células marcadas anti-HLA-G (o usando otros anticuerpos que diferencien células de trofoblastos fr células maternas presente en el cérvix) o (2) con perlas/nanopartículas magnéticas de afinidad anti-HLA-G para aislar células de trofoblastos. Después se pueden realizar análisis genéticos, inmunológicos u otros análisis bioquímicos mediante una diversidad de enfoques de células completas. Por ejemplo, podrían ser aceptables PCR con o sin transcripción inversa, análisis histoquímicos inmunológicos, amplificación del genoma completo (WGA) seguida de hibridación o secuenciación genómica comparativa, ensayos de metabolitos, ensayos de compuestos pequeños y otros ensayos. Alternativamente, se puede evaluar DNA fetal y materno en muestras transcervicales no fraccionadas usando un enfoque digital de PCR.

60 Los análisis genéticos pueden incluir, por ejemplo, FISH, secuenciación o métodos basados en PCR. Alternativamente, también se pueden usar perlas magnéticas antes de la fluorescencia inmunológica como manera de enriquecer las células de interés y análisis de la corriente de flujo. Hay disponibles perlas magnéticas Dynal de Invitrogen (Carlsbad, CA) con anticuerpos agregados o grupos químicos de acoplamiento que se pueden usar para agregar anti-HLA-G. Estos grupos se mezclan con las células después de su acidificación y neutralización y decoran células diana

(trofoblastos). Manteniendo un imán frente al tubo de ensayo o insertando el tubo en un dispositivo como el imán DynaMag®-Spin (Life Technologies) durante 5 minutos, se aspiran las células suspendidas, dejando las células unidas al imán recubiertas con perlas. Después de tres lavados, es posible enriquecer aproximadamente 1.000 a 10.000 veces, que sería adecuado para aislar la mayoría de las células de trofoblastos. Las células se pueden examinar con un microscopio para comprobar la presencia de perlas y separar a mano células sin perlas que contaminen la muestra. Después, se pueden realizar ensayos adicionales como los descritos con más detalle en la presente memoria.

En otra realización, las células de trofoblastos fetales se pueden aislar de las células maternas presentes después de su recogida para que se puedan usar en ensayos genéticos o bioquímicos. Para este fin se usa la especificidad del anticuerpo anti-HLA-G acoplándolo a nanopartículas magnéticas para aislamiento de trofoblastos. Por ejemplo, el método puede usar 10 µl de nanopartículas de 250 nm conjugadas a IgG anti-ratón o proteína A (Clemente Associates, Madison, CT) e incubadas con 5 µg de anticuerpo anti-HLA-G monoclonal de ratón (Clon: 4H84, BD Bioscience, San Diego, CA: o clon G233, Exbio, Prague) durante una noche en un agitador rotativo a 4°C. Las partículas se separan del anticuerpo no unido colocando los tubos en un imán DynaMag®-Spin (Life Technologies) durante 5 minutos y separando después el líquido manteniendo las nanopartículas magnéticas. Las células recogidas de una muestra transcervical se añaden después a las nanopartículas y se incuban a temperatura ambiente durante 1 a 24 horas en un agitador rotativo a 4°C. La muestra se magnetiza y se separan células no unidas. Después de tres lavados, se recuperan las células retenidas. El análisis de las células aisladas inmunomagnéticamente mediante microscopía de fluorescencia inmunológica con anti-βhCG para identificar células de trofoblastos reveló marcado del 95-100% de las células aisladas y durante la magnetización no se eliminó la tinción de las células agotadas (Tabla 1). En un ensayo realizado usando esta metodología, se recuperaron aproximadamente 500-2.000 células de cada muestra de las pacientes. Este enfoque para aislar las células de trofoblastos en su unión a anticuerpos que las diferencian de células cervicales maternas también se puede usar con otras tecnologías. Por ejemplo, se podría construir un dispositivo microfluídico para seleccionar las células basándose en un marcador magnético o fluorescente conjugado a un anticuerpo.

Además de la alta pureza de β-hCG que expresa células después del su aislamiento magnético inmunológico, las células de la fracción no unida no fueron marcadas por anti-β-hCG ni las células unidas fueron marcadas con IgG de control no inmune (Figura 1).

El método, como se ha descrito antes, usa las células aisladas para realizar ensayos bioquímicos o genéticos y obtener información sobre el feto o la placenta. Las células aisladas se clasifican en células individuales o grupos pequeños de células para ser ensayadas por dispersión en una placa de varias cavidades (como una placa Terasaki de varias cavidades) y clasificación con una micropipeta Stripper (Origio MidAtlantic Devices, purificación del RNAMt. Laurel, NJ). En un grupo de ensayo, se suspendieron 50 células en 200 µl de PBS y se centrifugaron sobre un portaobjetos utilizando una centrifugadora Shandon Cytospin 3 a 1.500 rpm durante 5 minutos. Estas células fetales se pueden usar para análisis de expresión de proteínas por microscopía de fluorescencia inmunológica o para análisis molecular por FISH. Por ejemplo, las células fueron marcadas con anticuerpos que reconocían proteínas específicas de trofoblastos o proteínas que son expresadas por diversas subpoblaciones de trofoblastos. Los resultados indican que las células aisladas no son de vellos coriónicos sino células de trofoblastos extravelllosos intensamente invasivos (Tabla 2). Esto indica que células de trofoblastos que invaden la base de la placenta emigran tan lejos como al cérvix cuando son recogidas por muestreo transcervical. Esto puede ser beneficioso para el desarrollo posterior de protocolos de ensayo e incrementa la cantidad de información que se puede obtener durante el embarazo. Se podría usar clínicamente un enfoque similar para examinar las células aisladas como marcadores biológicos de proteínas de trastornos fetales o trastornos obstétricos maternos.

Alternativamente, las células pueden ser clasificadas o identificadas y aisladas para análisis moleculares usando métodos apropiados a partir de métodos simples usados para análisis genéticos de células a las que se ha realizado una biopsia por implantación previa de embriones generados por fertilización *in vitro* (IVF). Se pueden clasificar células de trofoblastos aislados (hasta 100) con una micropipeta Stripper como células simples que se colocan individualmente en tubos de PCR de paredes finas con 2 a 6 µl de agua exenta de RNasa y congelada a -80°C. Estas células se pueden usar para ensayar en sondas su RNA o DNA usando métodos de amplificación, como PCR o WGA. Para ensayos de RNA, es necesario estabilizar el RNA después de haber separado de la solución fijadora las células fijadas. Por lo tanto, los lavados iniciales de las células en PBS, incubaciones con nanopartículas acopladas a HLA-G y manipulación de células en partes alícuotas se realizan usando PBS suplementada con complejo de ribonucleósido-vanadilo 20 mM (New England BioLabs Inc.) para prevenir degradación del RNA. Las células deben ser sometidas inmediatamente a lisis para la purificación del RNA y almacenadas a -80°C en una solución de lisis caotrópica o convertidas en cDNA antes de almacenarlas. También es posible realizar análisis de proteínas que se reducen proporcionalmente a una sola célula o a grupos pequeños de células, como ensayo inmunoenzimático (ELISA) o espectrometría de masas. Después de la WGA, se puede usar el DNA (5-50 microgramos) en enfoques de microformación o secuenciación intensa para examinar mutaciones genéticas, identificar trastornos de números de cromosomas (aneuploidías) u obtener secuencias genómicas completas para medicina personalizada. Se pueden evaluar polimorfismos genéticos para compararlos con polimorfismos parentales y confirmar que el DNA amplificado es de origen fetal, no de origen parental, como control de seguridad de la calidad.

En otra realización, las células fetales se pueden aislar de las muestras transcervicales sin una fijación inicial usando el conservante del estuche. Esto permite mejor recuperación de células y un análisis más preciso de constituyentes de células menos estables (por ejemplo, metabolitos, RNA) y la posibilidad de proliferar células para obtener cantidades mayores de DNA fetal o producir células en metafase para tipificación de cariotipos.

5 El aislamiento se puede realizar lavando el cepillo citológico (usado como se detalla en la presente memoria) en medio de cultivo de tejidos RPMI 1.640 enfriado con hielo, que contiene 10% de suero fetal bovino y 50 µg de gentomicina/ml u otras combinaciones comparables de medios de cultivo con antibióticos. La muestra se puede llevar rápidamente al laboratorio y lavar tres veces por centrifugación y nueva suspensión en PBS estéril a 4°C. Después se combinan con las células las nanopartículas magnéticas conjugadas con IgG anti-ratón que se habían unido con HLA-G anti-ratón y se incuban a 4°C durante 1 hora. Las células fetales se recuperaron por incubación a 4°C en un imán DynaMag-Spin (Life Technologies) y separación de células no unidas. Se repitió dos veces más esta etapa y se recuperaron las células en 100 µl de PBS enfriada con hielo.

15 Las células fetales aisladas se cultivaron en medio de cultivo estándar de trofoblastos (Kiburn et al., 2000) o se fijaron para realizar ensayos histoquímicos inmunológicos. Las células fijadas formaron pequeñas colonias en 2-3 días. Lo cual indica que estaban proliferando. Las células fijadas se marcaron con anticuerpo contra la subunidad β de hCG o BCL-2, seguido de anticuerpo secundario fluorescente. Todas las células aisladas fueron marcadas positivamente con ambos anticuerpos, lo cual indica que realmente eran trofoblastos y no apoptóticas.

Además de los beneficios antes reseñados, un beneficio del enfoque con una sola célula es que se puede reducir a casi cero la probabilidad de resultados falsos. La fuente principal de error está en la contaminación de células de trofoblastos aislados con células maternas. En general, no hubo más de 5% de contaminación con células maternas. Se usaron ensayos de células de trofoblastos individuales replicados para amplificación múltiple de secuencias de genes en los cromosomas X (*DMD*) o Y (*SRY*) para determinar el sexo de los correspondientes fetos. Todas las reacciones deben generar un producto para X si está presente una sola célula y se está realizando PCR, pero sólo células masculinas generarán un amplicón Y. Por lo tanto, el análisis de los productos de la PCR mediante electroforesis de gel de agarosa debe producir una sola banda si la célula es femenina o dos bandas si es masculina. Se analizaron diez células de cada muestra y todas produjeron una sola banda (fetos femeninos) o todas produjeron bandas dobles (Figura 2). La banda única ocasional en una muestra masculina es presumiblemente una célula materna contaminante, aunque no se encontró esto en 18 pacientes que se analizaron de esta manera (Tabla 3). No se pudieron diferenciar células maternas en muestras femeninas. La alta pureza de las células de trofoblastos se manifiesta en las muestras masculinas en las que no había células que produjeran una banda única. Para producir una diagnosis falsa, todas las células tenían que ser maternas. En el caso de un feto femenino, la diagnosis sería también femenina y correcta. En el caso de un feto masculino, la presencia incluso de una célula fetal podría producir una banda doble, que indica que el feto probablemente no es femenino. Después se podría repetir el ensayo o investigar más la muestra. La probabilidad de que todos los replicados sean células maternas disminuye exponencialmente con el número de replicados y llega a ser 1 en 8.000 con sólo tres replicados, suponiendo que las células aisladas contienen 95% de células de trofoblastos. Este nivel de seguridad se alcanza con cuatro replicados si las células contienen sólo 90% de trofoblastos. En el caso de una pureza del 90%, la probabilidad de un resultado falso (P) es 0,1 para un replicado (N) y disminuye diez veces con cada replicado de célula única adicional, en donde $P = 10^{-N}$.

40 La discusión anterior proporciona una base objetiva para los métodos y usos descritos en la presente memoria. Los métodos usados en la presente invención y la utilidad de ésta se pueden demostrar por los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

45 Materiales y métodos

Se inscribieron pacientes de 18-40 años de edad que necesitaban cuidados prenatales, con un embarazo intrauterino normal (IUP; $n = 37$) u óvulo destruido (BO; $n = 5$) para la recogida de muestras transcervicales usando un cepillo citológico y un estuche ThinPrep® (Hologic). Las muestras recogidas en solución fijadora PreservCyT® se limpiaron de mucus por acidificación y se lavaron por centrifugación y se preparó una parte alícuota sobre el portaobjetos de un microscopio usando una centrifugadora Cytospin 3. Los portaobjetos se marcaron con anticuerpo monoclonal G233 que reconocía HLA-G, un antígeno MHC expresado específicamente por células de trofoblastos. En cada portaobjetos se identificaron y contaron todas las células HLA-G positivas. Después de teñir con hematoxilina, se determinó el número total de células presentes en cada portaobjetos y se calculó la relación de células HLA-G positivas a células totales. Se compararon los datos usando ANOVA unidireccional, el ensayo posthoc de Student Keuls y análisis de características operativas de la receptora (ROC).

55 Resultados

Los tiempos medios de gestación de IUP, EP y NO normales fueron 9, 8 y 10 semanas respectivamente. Se observaron células de trofoblastos en 35/37 muestras de IUP normal, 6/10 muestras de EP normal y 4/5 muestras de BO normal. La frecuencia de células HLA-G positivas en las muestras cervicales de IUP fue aproximadamente 1 en 2.000, que era 5 a 10 veces mayor ($p < 0,001$) que la frecuencia media en muestras de pacientes con EP o BO. Los dos últimos grupos no fueron significativamente diferentes. Significativamente, el análisis ROC indicó que los embarazos EP y BO eran distinguibles de embarazos normales con una sensibilidad del 93% y una especificidad del 95%.

Conclusión

Se pueden identificar de modo fiable células de trofoblastos entre células cervicales en el primer trimestre mediante tinción histoquímica inmunológica en HLA-G. Se pueden predecir embarazos anormales basándose en la abundancia de trofoblastos.

Ejemplo 2

La preeclampsia (PE) y restricción del desarrollo intrauterino (IUGR) son consecuencias adversas comunes de embarazos sin medios fiables para una detección prematura. Los intentos usando grupos de proteínas séricas para identificar pacientes con PE o IUGR antes de que se manifiesten los síntomas han sido contradictorios. Ambos trastornos están ligados a una remodelación deficiente de la vascularización uterina por células de trofoblastos extravellosos (EVT). Se pueden captar EVT presentes en el canal endocervical en un procedimiento no invasivo similar a un test de Papanicolau y aislarlas exentas de células maternas. Se desregulan marcadores biológicos séricos de IUGR y PE en EVT en gestación antes de que sus niveles alterados puedan ser detectados en el suero.

Métodos

Se recogieron muestras para el test de Papanicolau ($N = 23$) a las 5-20 semanas de gestación usando un cepillo citológico. Posteriormente se examinaron informes médicos para la diagnosis de PE o IUGR. Se aislaron células de EVT (500-1.500) usando anticuerpo HLA-G acoplado a nanopartículas magnéticas. Se colocaron células (aproximadamente 50) en portaobjetos usando una centrifugadora citológica Cytospin 3, se evaluó su pureza con anti- β -hCG y se marcaron por fluorescencia inmunológica con anticuerpos (R&D Systems) frente a galectina 13 (LGAL13, a.k.a. PP13), galectina 14 (LGAL514), factor de crecimiento placentario (PGF), proteína plasmática A asociada a embarazos (PAPPA), proteína fetal alfa (AFP), endoglina (ENG) o tirosina-quinasa 1 relacionada con fms (FLT-1). Se intensificó la intensidad de la fluorescencia (FI) de células individuales mediante análisis de las imágenes. Se calculó la media de los valores de la FI de 20 células de cada paciente y se comparó por ANOVA entre grupos de resultado normal y adverso, usando el ensayo post-hoc de Tukey.

Resultados

Nueve pacientes desarrollaron con el tiempo PE o IUGR mientras que 14 tuvieron embarazos normales. La expresión de LGALS13, LGALS14, PAPPA y PGF, disminuyó cada una de ellas ($p < 0,05$) en EVT en embarazos que después desarrollaron PE/IUGR en comparación con embarazos normales. El FLT-1, ENG y AFP se incrementaron ($p < 0,05$) con PE/IUGR.

Conclusiones

Un nuevo enfoque de la adquisición no invasiva de células de EVT permite comparar niveles de expresión de proteínas con resultados de embarazos. Estos descubrimientos identificaron un grupo robusto de marcadores biológicos de EVT que podrían informar durante el primer y segundo trimestre sobre el riesgo de que la paciente padezca PE o IUGR.

Ejemplo 3

As 5 semanas de gestación, se pueden recoger del canal endocervical, de modo no invasivo, células de trofoblastos usando un cepillo citológico. Estas células se pueden aislar de células maternas usando el marcador fetal específico HAL-G.

Métodos

Después de aislar de pacientes embarazadas en el primer y segundo trimestre, se analizaron las muestras mediante ensayos histoquímicos inmunológicos usando un procedimiento de separación magnética de nano partículas sin columna. La pureza de las muestras de trofoblastos se calculó usando tinción para β -hCG. Después de la amplificación del genoma completo (WGA) de DNA de células fetales y maternas, se realizó el ensayo de polimorfismo de nucleótidos simples (SNP) e identificación del sexo mediante reacción en cadena por polimerasa.

Resultados

Después de aislarlas de muestras de 5 pacientes, se compararon las células fetales y maternas. La recuperación total media de trofoblastos fue 700 células y la pureza media fue mayor que 90%. Se obtuvo después de la WGA un mínimo de 10 μ g de DNA usando una célula individual o grupos de 5-100 células. En todas las muestras, los ensayos de SNP

demonstraron diferencias alélicas entre células fetales y maternas. Se identificó y confirmó el sexo a partir de registros de las pacientes.

Conclusiones

5 Se pueden recoger y aislar células de trofoblastos del canal endocervical con una pureza aceptable basándose en su alto grado de expresión de β -hCG. Además, el DNA fetal fue distinto del DNA materno, lo cual indica su utilidad como plataforma para ensayos prenatales no invasivos del genoma fetal intacto.

A lo largo de esta solicitud, diversas publicaciones, incluidas patentes de los Estados Unidos, han sido referenciadas por el autor indicando el año y el número de ellas. Se incluye citas completas de las publicaciones.

10 Se ha descrito la invención de manera ilustrativa y se debe entender que la terminología usada debe ser considerada como naturaleza de la descripción y no como limitación.

Obviamente, a la luz de la descripción anterior son posibles muchas modificaciones y variaciones. Por lo tanto, se debe entender que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la presente invención se puede realizar de un modo distinto al descrito específicamente.

REFERENCIAS

- Imudia AN, Kumar S, Diamond MP, Decherney AH, Armand DR: Transcervical retrieval fetal cells in the practice of modern medicine: a review of the current literature and future direction. *Fertil. Steril.*, 2010; 93: 1.725-1.730.
- 5 Imudia AN, Suzuki Y, Kulburn BA, Yelian FD, Diamond MP, Romero R, Armand DE: Retrieval of trophoblast cells from the cervical canal for the prediction of abnormal pregnancy: a pilot study. *Hum. Reprod.*, 2009; 24: 2.086-2.092.
- Orr JW Jr, Barrett IM, Orr PF, Holloway RW, Olimon FL. The efficacy and safety of the cytobrush during pregnancy. *Gynecol. Oncol.* 1992;44: 260-262.
- Rivlin ME, Woodliff IM, Bowlin RB, Moor JI Jr, Martin RW, Grossman JH, 3^a, Morrison JC: Comparison of cytobrush and cotton swab for Papanicolau smears in pregnancy. *J. Reprod. Med.* 1993; 38: 147-150.
- 10 Paraiso MF, Brady K, Helmchen R, Roat TW: Evaluation of the endocervical Cytobrush and Cervex-Brush in pregnant women. *Obstet. Gynecol.* 1994; 84: 539-543.
- Foster JC, Smith HL: Use of the Cytobrush for Papanicolau smear screens in pregnant women. *J. Nurse. Midwifery.* 1996; 41: 211-217.
- 15 Holt J, Stiltner L, Jamieson B, Fashner. J. *Clinical Inquiries.* Should a nylon brush be used for Pap smears from pregnant women? *J. Fam. Pract.* 2005; 54: 463-464.
- O'Leary P, Breheny N, Dickinsn JE, Bower C, Goldblatt J, Hewitt B, Murch A, Stock R: First trimester combined screening for Down syndrome and other fetal anomalies. *Obst- Gynecol.* 2006; 107: 869-876.
- Wapner RJ. Invasive prenatal diagnostic techniques. *Semin. Perinatol.* 2005; 29: 401-404.
- 20 Handyside AH, Kontoglanni KH, Hardy K, Winston RM: Pregnancies from Biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA Amplification. *Nature (London)* 1990; 344-768-770.
- Munne S, Howles CM, Wells D: The role of preimplantation genetic diagnosis in diagnosing embryo aneuploidy. *Current Opin. Onstet. Gynecol.* 2009;21: 442-449.
- 25 Lun FM, Tsui NB, Chan KC, Leung TY, Foo Y, Wanapirak C, Sanguansermesri T, Cantor CR, Chiu RW, Lo YM: Non invasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc- Natl. Acad. Scii. USA.* 2008; 105: 19.920-19.925.
- Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Zeng W, Leung TY, Foo CH, Xie B, Tsui MB, Lun FM, Zee BC, Lau TK, Cantor CR, Lo YM. Non invasive prenatal diagnosis of fetal chorosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105; 20.458-20.463.
- 30 Devaney SA, Palomaki GE, Scott JA, Bianchi DW: Noninvasie fetal sex determination using cell free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2011; 306: 627-636.
- Clony R, Bussani C, Bucciantini S, Scarsell G: Fetal cells in a transcervical cell simple collected at 5 weeks of gestation, *Journal of Maternal Fetal & Neonatal Medicine.* 2005; 18: 271-273.
- 35 Kilburn BA, Wang J, Dunier-Dmushoski ZM, Leach RE, Romero R, Armand DR: Extracellular matrix composition and hypoxiz regulate the expression of HLA-G and integrins in a human trophoblast cell line. *Biol. Reprod.* 2000; 62: 739-747.

Tabla 1

Purificación de células de trofoblastos

5 Se aislaron células de trofoblastos de 24 muestras transcervicales de mujeres embarazadas, con HLA-G acoplado a nanopartículas de IgG humana. Se usó el recuento de células marcadas con HLA-G para predecir el número de células esperadas después de la purificación y estimar índices de recuperación. En las células purificadas se evaluó la expresión de β hCG mediante microscopía de fluorescencia inmunológica y se indica el porcentaje de células marcadas positivamente (n = 55 a 1.500 recuentos por muestra)

Paciente	Trofoblastos esperados	Trofoblastos recuperados (% de los esperados)	β -hCG+ (%)
1	609	998 (164)	95
2	1.260	248 (20)	99
3	466	660 (141)	99
4	1.108	345 (31)	98,8
5	2.467	832 (35)	99,2
6	239	270 (116)	99,6
7	2.222	1.462 (66)	97,8
8	1.009	818 (81)	99,6
9	677	855 (119)	99,6
10	581	720 (124)	99,3
11	570	570 (100)	99,5
12	1.027	622 (61)	100
13	314	314 (282)	100
14	850	578 (68)	98,9
15	593	510 (86)	100
16	820	705 (86)	100
17	842	623 (74)	98
18	575	593 (103)	100
19	1.045	728 (70)	98,9
20	1.109	495 (45)	96,4
21	879	758 (86)	100
22	529	1.463 (276)	98,4
23	1.095	1.020 (93)	100
24	609	660 (108)	100
Media		101 \pm 13%	99 \pm 0,25%

Tabla 2

Reactividad de células aisladas con un grupo de anticuerpos para distinguir subtipos

Se realizó o no tinción en todas las células ensayadas según se indica en la columna derecha con anticuerpos contra las proteínas relacionadas en la columna izquierda. Las tres columnas del centro indican los modelos de expresión conocidos de las proteínas en trofoblastos humanos

5

Proteína	Trofoblasto veloso sincitial	Trofoblasto veloso citológico	Trofoblasto extraveloso	Células HLA-G+
HLA-G	-	-	+	+
hCG, subunidad β	+	+	+	+
KRT7	+	+	+	+
hPL	+	+	+	+
PSG-1	+	-	-	-
Integrina $\alpha 6$	+	+	-	-
E-cadherina	+	+	-/+	-
VE-cadherina	-	-	+	+
PECAM 1	-	-	+	+
Integrina $\alpha 1$	-	-	+	+
MMP9	-	+	+	+

Tabla 3

Resumen de resultados de la determinación del sexo fetal

Se realizaron ensayos de PCR como en la figura 2 para amplificar secuencias de cromosomas X e Y. En la tabla se indica número del paciente P y en las columnas de cromosoma X y cromosoma Y se indica la relación de células que dieron una banda (células positivas) / células totales ensayadas. El sexo fetal se confirmó por ultrasonidos o al nacer

5

Paciente	Semana de gestación	Cromosoma X (% de células positivas)	Cromosoma Y (% de células positivas)	Sexo comprobado
1	6	25/30 (83,3)	0/30 (0)	Femenino
2	9,2	10/10 (100)	10/10 (100)	Masculino
3	14,6	18/20 (90)	18/20 (90)	Masculino
4	7,6	25/25 (100)	0/25 (0)	Femenino
6	17,6	10/10 (100)	0/10 (0)	Femenino
7	10	10/10 (100)	10/10 (100)	Masculino
8	17,5	10/10 (100)	10/10 (100)	Masculino
9	7,3	5/5 (100)	5/5 (100)	Masculino
10	11	10/10 (100)	10/10 (100)	Masculino
11	15,2	9/10 (90)	9/10 (90)	Masculino
13	7,5	10/10 (100)	10/10 (100)	Masculino
14	12	10/10 (100)	0/10 (0)	Femenino
20	12,4	10/10 (100)	0/10 (0)	Femenino
21	12	9/10 (90)	0/10 (0)	Femenino
23	10	10/10 (100)	0/10 (0)	Femenino
24	8	25/28 (89,3)	25/28 (89,3)	Masculino
25	14	6/6 (100)	6/6 (100)	Masculino
26	12	24/26 (92,3)	24/26 (92,3)	Masculino

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de recoger células fetales de una muestra endocervical, que comprende las etapas de separar mucus de la muestra endocervical, con lo que se disocian las células fetales y las células maternas en la muestra endocervical, y aislar las células fetales disociadas en la muestra cervical usando clasificación magnética inmunológica de las células fetales en suspensión.
2. El método según la reivindicación 1, en donde la citada etapa de aislamiento incluye aislar células fetales en masa.
3. El método según la reivindicación 1, en donde la muestra se obtiene por lavado intrauterino, aspiración de mucus cervical o separación de tejido de la superficie del canal endocervical.
- 10 4. El método según la reivindicación 1, que comprende además cultivar la muestra en un medio de cultivo de trofoblastos.
5. El método según la reivindicación 1, que comprende además colocar la muestra en una solución fijadora.
6. El método según la reivindicación 1, en donde la citada etapa de separación incluye separar el mucus de la muestra endocervical por acidificación.
- 15 7. El método según la reivindicación 1, que comprende además identificar células aisladas en la muestra con fine diagnósticos.
8. El método según la reivindicación 7, en donde la citada etapa de identificación incluye analizar células usando un método del grupo que consiste esencialmente en hibridización fluorescente *in situ*, secuenciación, reacción en cadena con polimerasa con transcripción inversa, reacción en cadena con polimerasa sin transcripción inversa y ensayos histoquímicos inmunológicos-.
- 20 9. El método según la reivindicación 7, que incluye además analizar las células identificadas usando un método seleccionado del grupo que consiste esencialmente en amplificación del genoma completo seguida de hibridización o secuenciación genómicas, ensayos de metabolitos y ensayos de compuestos pequeños.
- 25 10. Un método de detectar preeclampsia o restricción del crecimiento uterino en una mujer embarazada, que comprende las etapas de:
 obtener células de trofoblastos extravelosos fetales aisladas preparadas usando el método según la reivindicación 1, en donde las células de trofoblastos extravelosos fetales son de muestras PAP recogidas a las 5-20 semanas de gestación; y
 ensayar las células de trofoblastos extravelosos fetales aislados con un anticuerpo contra una proteína fetal seleccionada de: galectina 13, galectina 14, factor de crecimiento placentario, proteína plasmática A asociada al embarazo, roteína fetal alfa, endoglina y tirosina quinasa 1, en donde una cantidad menor de galectina 13, galectina 14, factor de crecimiento placentario y proteína plasmática A asociada al embarazo y una cantidad mayor de proteína fetal alfa, endoglina y tirosina quinasa 1 relacionada con fms son indicativas de preeclampsia o restricción de crecimiento intrauterino.
- 30 11. El método según la reivindicación 1, en donde el método se usa para la identificación de células fetales entre células cervicales, determinación de la densidad de células fetales para predecir embarazos de alto riesgo, análisis genético de células fetales o determinación de marcadores biológicos de trastornos obstétricos seleccionados del grupo que consiste en factores de crecimiento, proteínas y RNA.
- 35

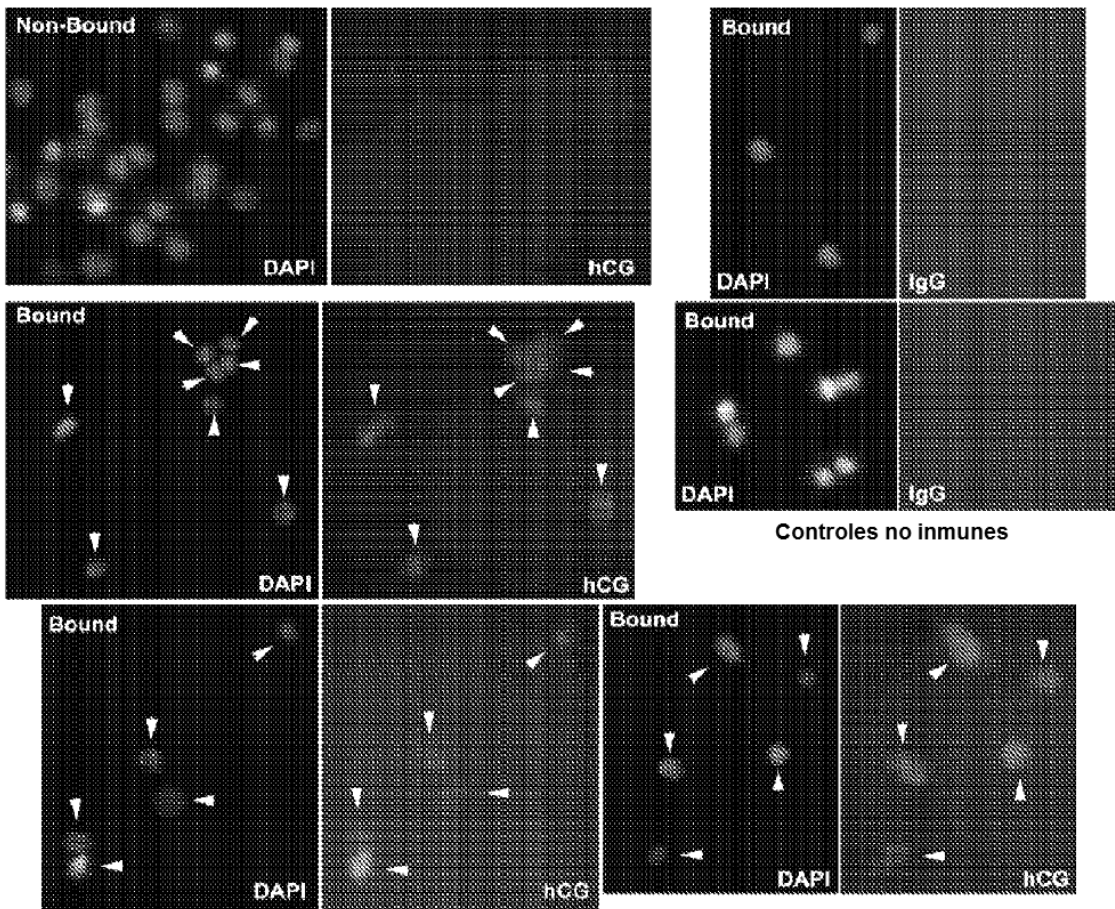


Fig. 1

Fig. 2

Cebadores

