

Aislamiento de eritroblastos en sangre materna. Utilidad en el diagnóstico precoz de preeclampsia*

A. Fernández Fernández¹, B. Prieto¹, A.I. Escudero², J.H. Ladenson³, F.V. Álvarez Menéndez^{1,4}

Resumen

La preeclampsia es un trastorno hipertensivo caracterizado por proteinuria que se produce en el tercer trimestre del embarazo y una de las principales causas de morbi-mortalidad materna y fetal. La ausencia de una prueba bioquímica específica que permita su diagnóstico precoz ha propiciado la búsqueda de nuevos marcadores. En presencia de preeclampsia se ha descrito un aumento del número de eritroblastos, de origen tanto materno como fetal, en sangre materna. El objetivo de este estudio es comprobar la capacidad de un anticuerpo no comercial, desarrollado por nuestro grupo de investigación, para detectar dicho aumento del número de eritroblastos en gestantes con hipertensión inducida por el embarazo, y por tanto, riesgo de desarrollar preeclampsia, y comparar la utilidad diagnóstica del aislamiento de eritroblastos en sangre materna con respecto a las pruebas bioquímicas habituales. El aislamiento de eritroblastos se realizó mediante separación celular activada magnéticamente (MACS), con un anticuerpo monoclonal no comercial, 2F6.3, anti-CD71. Se revisó la bioquímica solicitada al ingreso y durante el seguimiento de las gestantes, considerando como signos bioquímicos de la enfermedad el aumento de las concentraciones de aminotransferasas o urato, o la disminución de las concentraciones de proteína o albúmina. El número de eritroblastos aislados en el grupo de gestantes diagnosticadas de preeclampsia fue significativamente mayor. Con una eficacia diagnóstica del 75%, el aislamiento de eritroblastos en sangre materna aporta una mayor utilidad que las pruebas bioquímicas tradicionales para el diagnóstico de la preeclampsia.

Palabras clave: Eritroblastos. Diagnóstico Prenatal. Hipertensión. Inducida en el Embarazo. Preeclampsia.

Summary. Isolation of erythroblasts in maternal blood. Utility in early diagnosis of preeclampsia

Pre-eclampsia is a hypertensive disorder characterized by proteinuria that develops along the third trimester of pregnancy. It constitutes one of the main causes of fetal-maternal morbidity and mortality. New markers have been searched due to the lack of a specific biochemical test which can lead to an early diagnosis. In pre-eclampsia, an increased number of erythroblasts, from maternal and fetal origin, has been described in maternal blood. The aim of the present work was to test the ability of a non-commercial antibody, developed by our group, to detect the increase of erythroblasts in patients with pregnancy-induced hypertension and thus at risk of developing pre-eclampsia. We also aimed to compare the diagnostic efficiency of erythroblast isolation from maternal blood with that of usual biochemical tests. Erythroblasts were isolated by magnetic activated cell sorting (MACS) with 2F6.3 antibody, which specifically recognizes the CD71 receptor. An increase in alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase or urate, as well as a decrease in serum total protein or albumin, were considered as potential markers of the disease. The number of isolated erythroblasts was significantly higher in pregnant women who developed pre-eclampsia. Erythroblast isolation from maternal blood by means of 2F6.3 antibody also showed higher diagnostic efficiency (75%) than biochemical tests.

Key words: Erythroblasts. Prenatal Diagnosis. Hypertension. Pregnancy-Induced. Pre-Eclampsia.

INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial (HTA) es una de las complicaciones más frecuentes durante el embarazo. Algunas mujeres con una hipertensión gestacional desarrollan preeclampsia, una combinación de HTA y un aumento en la concentración de proteínas en orina que se produce a partir de la semana 20 del embarazo y constituye una de las principales causas de morbi-mortalidad

materna y fetal (1). Los factores de riesgo que desencadenan en algunas de estas pacientes una isquemia placentaria, induciendo una alteración endotelial diseminada, aún no han sido claramente establecidos. El vasoespasmo generalizado, con una reducción del volumen plasmático e hipercoagulabilidad, son las causas de una hipoperfusión multiorgánica que disminuye el aporte útero placentario, originando las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Las complicaciones maternas descritas son: alteraciones visuales (por un vasoespasmo cerebral, sobre todo del área occipital), insuficiencia renal (por lesiones microvasculares), edema de pulmón (por la pérdida de la integridad vascular y la disminución de la concentración de proteínas en la sangre), insuficiencia hepática (por necrosis hepatocelular con depósitos de fibrina), accidente vascular-cerebral (por vasoespasmo) y alteraciones de la coagulación (por hipercoagulabilidad plaquetaria con secuestro de las

¹Servicio de Bioquímica, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Asturias

²Servicio de Ginecología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Asturias

³Laboratory of Medicine, Washington University, St. Louis (MO), USA

⁴Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo, Asturias

* Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XXIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Valladolid el 19, 20 y 21 de octubre de 2005.

mismas en la pared vascular). Con respecto a las complicaciones fetales, se incluye el retraso del crecimiento intrauterino, el riesgo de pérdida de bienestar fetal y la muerte perinatal (2,3)

Actualmente, no existe una prueba bioquímica específica que permita diagnosticar la enfermedad antes de que se manifieste clínicamente, por lo que el tratamiento se reduce a los estados hipertensivos graves (gestantes sintomáticas). Como consecuencia, la preeclampsia es una de las principales causas de una prematuridad electiva en interés materno y/o fetal (4).

El descubrimiento de células fetales en sangre materna ha abierto grandes expectativas con respecto a la posibilidad de desarrollar un método no invasivo de diagnóstico prenatal, que permitiría reducir el empleo de los métodos tradicionales de obtención de tejido fetal, como la amniocentesis o la biopsia corial, minimizándose por tanto el riesgo de aborto. En 1893, Schmorl describe, por primera vez, el aislamiento de trofoblastos en pulmones de mujeres fallecidas por eclampsia (5). Pero fue el desarrollo de métodos suficientemente sensibles para la detección y el análisis de células fetales aisladas de sangre materna, en la década de los años noventa, lo que impulsó a diversos grupos de investigación a estudiar las condiciones ideales para su aislamiento (6-8). Por sus características, el eritroblasto se ha revelado desde un principio como una célula diana interesante. En primer lugar, se trata de una célula nucleada, por lo que contiene la información genética del feto. Además, presenta la ventaja de que prácticamente no se encuentra en la sangre de adultos sanos, pero sí en sangre fetal a partir de la semana octava de gestación (9). Por último, su corta vida media, aproximadamente 30 días (10), hace improbable el aislamiento de eritroblastos de embarazos previos (11).

Diversos estudios han descrito la posible utilidad del aislamiento de eritroblastos fetales de sangre materna para la detección de aneuploidías fetales, el estudio del estado RhD fetal, el análisis de enfermedades genéticas mendelianas o la detección de complicaciones obstétricas, como el parto pretérmino (12,13).

También existen antecedentes bibliográficos acerca del aumento del número de eritroblastos (maternos y fetales) en sangre periférica de gestantes con preeclampsia (14-16). Se desconoce la etiología de la enfermedad, pero parece ser que se produce un defecto en la placentación que va acompañado de una alteración del intercambio celular a su través (1,17,18). Aunque los síntomas clínicos aparecen a partir de la segunda mitad del embarazo, la patogenia de la enfermedad se produce mucho antes. El aumento del número de eritroblastos en sangre materna podría tener utilidad como marcador pronóstico si se detectase antes de que la enfermedad se manifieste clínicamente.

El método más utilizado para el aislamiento de eritroblastos en sangre materna es una separación celular activada magnéticamente (MACS), utilizando para ello anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos celulares. Nuestro grupo ha desarrollado una veintena de anticuerpos, la mayoría de los cuales reconocen específicamente el receptor de la transferrina (CD71) (19) con los que se ha puesto a punto un método de aislamiento de eritroblastos de sangre materna (20,21). Recientemente hemos descrito la mayor eficacia de uno de estos anticuerpos (2F6.3), con respecto a un anticuerpo anti-CD71 comercial, para el aislamiento de eritroblastos de sangre materna durante el tercer trimestre de gestación (22). En el presente trabajo se plantea estudiar la utilidad de este anticuerpo como marcador pronóstico de preeclampsia en gestantes hipertensas, y comparar su eficacia con la de las pruebas bioquímicas tradicionales, solicitadas ante la sospecha de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y muestras

En el estudio participaron 51 gestantes, de forma voluntaria y previo consentimiento informado aprobado por el Comité Ético Regional de Investigación Clínica. Veinticinco de las gestantes (entre 23 y 39 semanas de gestación) acudieron al Servicio de Urgencias del Hospital Universitario Central de Asturias con hipertensión arterial inducida por el embarazo. El resto de las participantes constituyeron un grupo control formado por gestantes entre 32 y 36 semanas de gestación sin complicaciones obstétricas.

A las pacientes se les extrajo 30 mL de sangre periférica, empleando EDTA.K₃ como anticoagulante. Las muestras fueron procesadas en las dos horas siguientes a la extracción.

Aislamiento e identificación de eritroblastos

Se realizó un enriquecimiento celular mediante un gradiente de doble densidad 1077/1107 (Histopaque, Sigma, St Louis, MO, USA). La población celular recuperada se incubó con un anticuerpo monoclonal no comercial de tipo IgG2, denominado 2F6.3, que se une al receptor de la transferrina (CD71). Este anticuerpo pertenece a un grupo de anticuerpos monoclonales desarrollados por nuestro grupo mediante inmunización de ratones con eritroblastos de hígado fetal. Posteriormente, se realizó un marcaje magnético mediante la incubación con un segundo anticuerpo comercial, anti-IgG2, que está enlazado a micropartículas superparamagnéticas (Miltenyi Biotec GmbH, Bergish, Gladbach, Alemania). La purificación de la fracción celular de interés (selección positiva) se realizó mediante separación celular activada magnéticamente (miniMACS system, Miltenyi Biotec GmbH, Bergish, Gladbach, Alemania), sistema desarrollado por Miltenyi et al. en la década de los noventa (23). En resumen, las células que expresen CD71 y hayan sido seleccionadas por el anticuerpo 2F6.3, al unirse éste a un segundo anticuerpo marcado con partículas magnéticas, quedarán retenidas a su paso a través de una columna miniMACS sometida a un campo magnético. Una vez haya pasado toda la suspensión celular a través de la columna, ésta se retira del campo magnético y se eluyen las células con tampón fosfato salino (PBS). La suspensión celular recuperada se deposita sobre portaobjetos mediante citocentrifugación (Cytospin 3, Shandon, Astmoor, UK). La identificación de los eritroblastos se realizó de acuerdo con la morfología observada al microscopio, previa tinción de las preparaciones con 3,3'-diaminobencidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) y hematoxilina. Se contó el número de eritroblastos en todas las preparaciones.

Bioquímica en sangre

Se revisó la historia clínica de las pacientes, recogiendo información sobre las determinaciones bioquímicas solicitadas durante el ingreso [alanino aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), urato y, en algunos casos, proteínas totales y/o albúmina]. Se consideraron marcadores bioquímicos de la enfermedad las elevaciones de las transaminasas y el urato, con respecto a los valores de referencia en plasma (AST: 1 - 31 UI/L, ALT: 1 - 40 UI/L; Urato: 3,4 - 5,7 mg/L), y la evolución de las mismas magnitudes durante el periodo en que la gestante estuvo en estudio por riesgo de desarrollar una preeclampsia.

Criterios diagnósticos de preeclampsia

Para el diagnóstico de la preeclampsia, se utilizaron los criterios de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (3): presión arterial diastólica superior a 90 mm Hg, en dos o más ocasiones, con una diferencia de al menos cuatro horas, y presencia de un aumento en la concentración de proteínas en orina, definida como una excreción superior a 0,3 g de proteínas en orina de 24 horas o más de dos cruces de proteínas en el sistemático de orina de dos muestras recogidas al azar en un intervalo de al menos cuatro horas de diferencia.

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SPSS 12.0 para Windows (SPSS Inc.). Debido a la distribución no gaussiana de los datos (prueba de Kolmogorov-Smirnov), se utilizaron pruebas no paramétricas para la comparación del número de eritroblastos aislados en los diferentes grupos de gestantes (prueba de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney).

RESULTADOS

Se comparó el número de eritroblastos aislados en las gestantes con hipertensión inducida por el embarazo respecto al grupo control formado por 26 embarazadas sin complicaciones obstétricas. Dentro del grupo de gestantes hipertensas ($n=25$) se consideraron a su vez otros dos grupos, uno constituido por las embarazadas que no desarrollaron preeclampsia ($n=16$) y otro con las que sí padecieron la enfermedad ($n=9$).

La figura 1 representa la distribución del número de eritroblastos aislados en estos dos grupos de gestantes hipertensas respecto al grupo control. Al comparar las medianas obtenidas en los tres grupos, 134 (intervalo: 9 - 1425) en el grupo control, 341 (intervalo: 24 - 3478) en las gestantes con hipertensión que no desarrollaron la enfermedad y 1506 (intervalo: 64 - 8335) para las gestantes diagnosticadas de preeclampsia, se observó un aumento estadísticamente significativo del número de eritroblastos (prueba de Kruskal-Wallis; $P=0,009$). Entre los dos grupos de gestantes con hipertensión inducida por el embarazo, se observaron asimismo diferencias significativas en el número de eritroblastos aislados de sangre materna (U de Mann-Whitney, $P=0,042$).

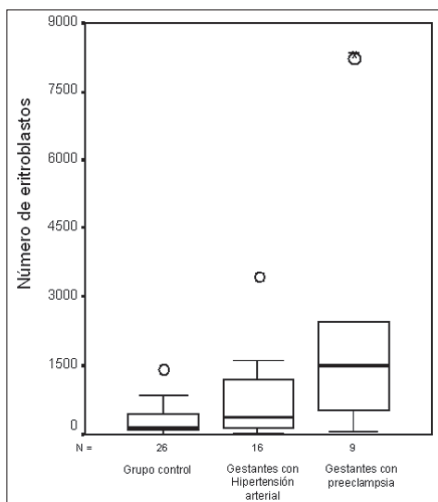


Figura 1. Diagrama de caja que representa la distribución del número de eritroblastos aislados en sangre materna de las gestantes hipertensas que desarrollaron preeclampsia, gestantes con hipertensión inducida por el embarazo que no desarrollaron la enfermedad y gestantes sin complicaciones obstétricas.

Para estudiar la utilidad diagnóstica del aislamiento de eritroblastos en sangre materna ante la sospecha de preeclampsia, en el grupo de gestantes con hipertensión inducida por el embarazo, se representó una curva ROC (figura 2). El área bajo la curva ($AUC=0,750$; IC al 95%: 0,530-0,970; $P=0,042$) indica una eficacia diagnóstica del 75% para el aislamiento de eritroblastos. Estableciendo como valor discriminante 475 eritroblastos, valor superior a la mediana obtenida en el grupo de gestantes con hipertensión inducida por el embarazo que no desarrollaron preeclampsia, se obtuvo una sensibilidad del 78% y una especificidad del 69% para el diagnóstico de la enfermedad.

Los resultados de las pruebas bioquímicas se valoraron con respecto a los intervalos de referencia correspondientes para cada magnitud. Se observaron alteraciones en la bioquímica solicitada al ingreso en 4 de las 9 gestantes diagnosticadas de preeclampsia (dos de ellas con elevación sólo de la AST, una con elevación del urato y otra con ambas magnitudes elevadas), mientras que sólo una de las 16 gestantes que no desarrollaron preeclampsia presentaba bioquímica alterada (AST elevada) (tabla I). Por otra parte, también se habían solicitado proteínas totales y/o albúmina al ingreso en 10 de las 25 gestantes hipertensas, presentando concentraciones disminuidas 4 de 9 gestantes que no desarrollaron preeclampsia y fisiológicas otra gestante que sí desarrolló la enfermedad.

DISCUSIÓN

La preeclampsia es una de las alteraciones más importantes asociada al embarazo. Actualmente no existe una prueba diagnóstica que permita establecer un tratamiento preventivo. La existencia de una alteración en el tráfico celular en una etapa temprana del embarazo abre las puertas a un diagnóstico precoz de la enfermedad.

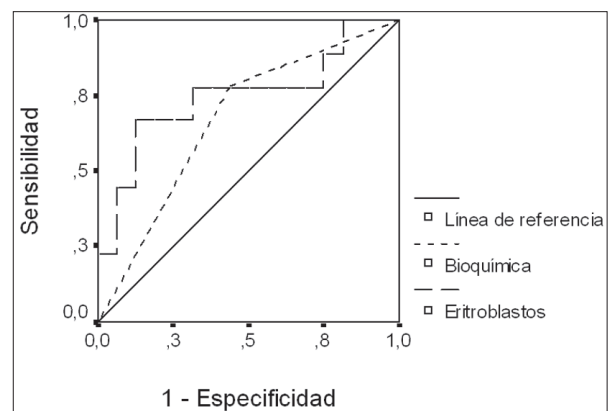


Figura 2. Curva ROC que compara la eficacia diagnóstica del aislamiento de eritroblastos en sangre materna y la bioquímica en sangre en el diagnóstico de preeclampsia.

Las gestantes con riesgo de padecer la enfermedad son mujeres con hipertensión inducida por el embarazo. Sin embargo, no todas las gestantes con HTA desarrollan preeclampsia, sino que es necesaria la presencia de un aumento en la concentración de proteínas en orina para que el diagnóstico quede totalmente establecido, hecho que

Tabla I. Resultados de Bioquímica y nº de eritroblastos obtenidos en gestantes diagnosticadas de preeclampsia. (N: normal; ↑: aumentado; ↓: disminuido)

Caso	ALT/AST	Urato	Proteínas totales/ albúmina
1	N	↑	N
2	N	N	↓
3	N	N	↓
4	↑	N	↓
5	↑	N	N
6	↑	N	N
7	N	N	↓
8	N	N	N
9	↑	↑	N

normalmente no se considera como tal antes de la semana 20 del embarazo. En este estudio participaron 25 gestantes hipertensas, de las cuales 9 fueron diagnosticadas de preeclampsia. Se comparó el número de eritroblastos aislados en estas gestantes respecto a un grupo control constituido por gestantes sin complicaciones obstétricas, de similar edad gestacional. Los resultados revelan un aumento del número de eritroblastos en las pacientes hipertensas respecto al grupo control y, lo que es más importante, un aumento del número de eritroblastos en las gestantes que posteriormente fueron diagnosticadas de preeclampsia respecto a las que no desarrollaron la enfermedad. Estos resultados concuerdan con los publicados por otros autores en los que se describe un aumento del número de eritroblastos en gestantes con preeclampsia (15,16).

Aunque se desconoce la etiología de la enfermedad, una de las causas probables es la presencia de un defecto en la placentación, que se produciría al inicio del embarazo. La alteración en el tráfico celular, por tanto, podría detectarse antes de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Se ha descrito que el aumento del número de eritroblastos en sangre materna se podría detectar a partir de la 20 semana de gestación. En este trabajo, la edad gestacional de las embarazadas con HTA está comprendida entre las semanas 23 y 39 de gestación. Se ha comprobado la existencia de un aumento del número de eritroblastos en las gestantes diagnosticadas de preeclampsia, pero para averiguar si ese aumento se puede utilizar como marcador pronóstico de la enfermedad sería necesario realizar un estudio con edades gestacionales más tempranas. En un trabajo publicado por Holzgreve et al (24), en el que participaron 100 embarazadas con una edad gestacional en torno a las 20 semanas gestacionales, se confirma ese aumento del número de eritroblastos en las gestantes que posteriormente desarrollaron preeclampsia.

En una segunda fase del presente estudio, se comparó la eficacia diagnóstica del aislamiento de eritroblastos de sangre materna mediante nuestro anticuerpo con respecto a las pruebas bioquímicas que se solicitan habitualmente ante una sospecha clínica de preeclampsia. En la revisión de la historia clínica de las pacientes se consideró la evolución de estas pruebas durante el tiempo de permanencia de las gestantes en el hospital, estableciendo como marcadores bioquímicos de preeclampsia la elevación de las transaminasas (ALT y AST) o del urato. Estas tres magnitudes son de utilidad en la valoración obstétrica a la hora de decidir, junto con los datos clínicos, si el riesgo es suficiente como para programar un parto electivo. También se registró, como dato adicional, la concentración de las proteínas totales y la albúmina en aquellos casos en que habían sido solicitadas estas determinaciones.

En la bioquímica realizada al ingreso, se observó que cuatro de las nueve gestantes diagnosticadas de preeclampsia tuvieron alteraciones en alguna de las magnitudes que se consideran relevantes para la valoración de la enfermedad (AST, ALT y urato), tres de las cuales también presentaron valores elevados de eritroblastos en sangre. Otras cuatro de estas nueve pacientes, que tuvieron bioquímicas no patológicas, también superaron el umbral de 475 eritroblastos que hemos establecido en el presente trabajo como posible valor de corte para valorar el riesgo de preeclampsia, revelando la utilidad del método propuesto en comparación con la de las pruebas bioquímicas. Una de las gestantes no tenía alteraciones bioquímicas ni tampoco un número considerable de eritroblastos en sangre materna, dado que se aislaron 135.

La revisión de las historias clínicas reveló que siete de estas nueve gestantes ya habían tenido un ingreso previo por hipertensión inducida por el embarazo con una edad gestacional temprana y habían sido dadas de alta con una bioquímica en sangre sin alteraciones, teniendo un segundo reingreso a las pocas semanas. La bioquímica en sangre de los anteriores ingresos no había sido tampoco suficientemente sensible y fue necesaria una segunda hospitalización en la que la existencia de un aumento en la concentración de proteínas en orina determinó el diagnóstico. Cabe destacar que una de estas siete pacientes no fue diagnosticada hasta el tercer ingreso, habiendo sido dada de alta en el segundo ingreso con una elevación del urato (6,7 mg/dL) como única alteración bioquímica, momento en el que se realizó el aislamiento de eritroblastos obteniendo una cifra de 2206, lo que podría haber sido de utilidad de haber sido considerado como factor adicional de riesgo de preeclampsia.

Al considerar la bioquímica de las gestantes con HTA que no desarrollaron la enfermedad, una de las 16 pacientes presentó una elevación de AST ya en el momento del ingreso. En cuatro de las 10 pacientes en que se determinaron adicionalmente proteínas totales y albúmina se observaron concentraciones disminuidas de ambas magnitudes sin ninguna asociación con la preeclampsia.

Los resultados obtenidos para la bioquímica en sangre no hacen más que confirmar que no existe una prueba lo suficientemente

Tabla II. Bioquímica en sangre en gestantes con hipertensión arterial inducida por el embarazo que no desarrollaron preeclampsia.

Caso	ALT/AST	Urato	Proteínas totales/Albúmina
1	N	N	↓
2	N	N	N
3	N	N	↓
4	N	N	↓
5	N	N	↓
6	N	N	↓
7	N	N	↓
8	↑	N	N
9	N	N	N
10	N	N	N
11	N	N	↓
12	N	N	N
13	N	N	↓
14	N	N	N
15	N	N	N
16	N	N	N

N: normal; ↑: aumentado; ↓: disminuido

sensible y específica que permita realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad.

Sin embargo, a la vista de los resultados, el aislamiento de eritroblastos de sangre materna sí podría ofrecer una ayuda al diagnóstico, y dado que nuestro anticuerpo 2F6.3 ha demostrado aislar una cantidad de eritroblastos similar o mayor que el anticuerpo comercial más frecuentemente empleado en la bibliografía con el mismo fin, estos resultados nos animan a considerar su utilidad como prueba complementaria en casos de sospecha de preeclampsia.

Agradecimientos

Este proyecto ha sido parcialmente financiado por la red europea "The Special Non-Invasive Advances in Fetal and Neonatal Evaluation Network (SAFE)" y por la fundación Cajastur.

Agradecemos su colaboración a todas las gestantes que han participado en el estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Roberts JM, Redman CWG. Pre-eclampsia : more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 1993 ;341:1447-51.
2. Dekker GA, Sibai BM. Early detection of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:160-72.
3. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. Protocolos asistenciales. Trastornos hipertensivos del embarazo; 1993.
4. Schmorl G. Pathologisch-anatomische Untersuchungen ueber Publereklampsie. Leipzig: Vogel, 1893.
5. Chueh J, Golbus MS. The search for fetal cells in the maternal circulation. *J Perinat Med* 1991; 19:411-20.
6. Holzgreve W, Garritsen HSP, Ganshirt-Ahlert D. Fetal cells in the maternal circulation. *J Reprod Med* 1992; 37:410-8.
7. Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol* 1999; 105:574-83.
8. Pertl B, Bianchi DW. First trimester prenatal diagnosis: fetal cells in maternal circulation. *Seminars in Perinatol* 1999; 23:393-402.
9. Pearson HA. Life-span of the fetal red blood cell. *J Pediatr* 1967;70:166-71.
10. Bianchi DW, Lo YMD. Fetomaternal cellular and plasma DNA trafficking: the yin and the yang. *Ann NY Acad Sci* 2001; 945:119-31.
11. Lo YMD. Non-invasive prenatal diagnosis using fetal cells in maternal blood. *J Clin Pathol* 1994; 47:1060-5.
12. Holzgreve W, Hanh S. Prenatal diagnosis using fetal cells and free DNA in maternal blood. *Clin Perinatol* 2001; 28:353-65.
13. Bischoff FZ, Sinacori MK, Dang DD, Marquez-Do D, Horne C, Lewis DE, et al. Cell-free fetal DNA and intact fetal cells in maternal blood circulation: implications for first and second trimester non-invasive prenatal diagnosis.
14. Holzgreve W, Ghezzi F, Di Naro E, Maymon E, Ganshirt D, Hanh S. Disturbed fetomaternal cell traffic in preeclampsia *Obstet Gynecol* 1998; 91:669-71.
15. Al-Muti R, Hambley H, Albaiges G, Lees C, Nicolaidis KH. Increased fetal erythroblasts in women who subsequently develop pre-eclampsia. *Hum Reprod* 2000; 15:1624-8.
16. Jansen MW, Korver-Hakkennes K, van Llenen D, Visser W, in 't Veld PA, de Groot CJ, et al. Significantly higher number of fetal cells in the maternal circulation of women with pre-eclampsia. *Prenat Diagn* 2001; 21:1022-6.
17. Ness RB, Roberts JM. Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175:1365-70.
18. Redman CW, Sargent IL. The pathogenesis of preeclampsia. *Gynecol Obstet Fertil* 2001; 29:518-22.
19. Álvarez FV, Olander J, Crimmins D, Prieto B, Alonso R, Porter S, et al. Development, characterization and use of monoclonal antibodies made to antigens expressed on the surface of fetal nucleated red blood cells. *Clin Chem* 1999; 45:1614-20.
20. Prieto B, Alonso R, Paz A, Cándenas M, Venta R, Ladenson JH, et al. Optimizaron of nucleated red blood cell (NRBC) recovery form maternal blood collected using both layers of a double density gradient. *Prenat Diagn* 2001; 21:187-93.
21. Prieto B, Cándenas M, Ladenson JH, Álvarez FV. Comparison of different CD71 monoclonal antibodies for enrichment of fetal cells from maternal blood. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40:126-31.
22. Fernández A, Prieto B, Escudero A, Ladenson JH, Álvarez FV. A monoclonal antibody with potencial for aiding non-invasive prenatal diagnosis: utility in screening of pregnant women at risk of preeclampsia. *J Histochem Cytochem* 2005; 53:345-50.
23. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 1990; 11:231-8
24. Holzgreve W, Li JJ, Steinborn A, Kulz T, Sohn C, Hodel M, et al. Elevation in erythroblast count in maternal blood before the onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:165-8.

Correspondencia

Francisco V. Álvarez Menéndez
Servicio de Bioquímica
Hospital Central de Asturias
Celestino Villamil s/n
33006 Oviedo (Asturias)
falvarez@arrakis.es