# ارزیابی ارزش تشخیصی ردیابی DNA آزاد جنینی در پلاسمای مادری جهت بررسی نارسایی های جنینی


• دکتر صدیقه شریف زاده

دکترای علوم آزمایشگاهی، دانشیار ایمونولوژی، مرکز تحقیقات علوم و فناوری تشخیص آزمایشگاه، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

sharifsd@sums.ac.ir

• زینب کشاورز

کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

**خلاصه**

در این مقاله سعی شده است جنبه‌های مختلف DNA آزاد جنینی در خون مادر از جمله منشا، اندازه و درصد آن در خون مادر بررسی شود. درصد کمی از DNA استخراج شده از پلاسمای مادر منشا جنینی دارد که مهم ترین مانع در استفاده از DNA آزاد جنینی در خون مادر برای تشخیص قبل از زایمان است. پس از کشف DNA آزاد جنینی در خون مادر، محققان زیادی سعی در راه اندازی روش‌های دقیق استخراج و ردیابی DNA جنینی از پلاسمای مادر کردند و اکنون استفاده از DNA آزاد جنینی در خون مادر برای تشخیص غیر تهاجمی قبل از زایمان آینده روشنی را انتظار می‌کشد.



**کلمات کلیدی**: DNA آزاد جنینی، تشخیص قبل از زایمان، پلاسمای مادری


**پیش زمینه**

مراقبت‌ها و تشخیص‌های قبل از زایمان (prenatal screening and prenatal diagnosis) نقش مهمی در مدیریت حاملگی‌ها توسط پزشکان را دارد و این فرصت را به والدین می‌دهد که در صورت وجود ناهنجاری شدید جنین، تصمیم مناسب پیرامون ادامه دادن یا

خاتمه حاملگی بگیرند. روش‌های متفاوتی برای اطمینان از وضعیت سلامتی جنین به کار می‌رود.

## روش‌های تهاجمی تشخیص قبل از زایمان

دو روش معمول برای انجام تست‌های تشخیص قبل از زایمان آمنیوسنتز (amniocentesis) و نمونه گیری از پرزهای کوریونی (CVS:chorionic villous sampling) است. آمنیوسنتز قبل از هفته ۱۵ حاملگی انجام می‌شود و طی آن یک سوزن از طریق دیواره شکم وارد رحم شده و مقداری از مایع آمنیوتیک به عنوان نمونه جهت بررسی خارج می‌شود. با انجام آمنیوسنتز احتمال سقط جنین نسبت به یک حاملگی طبیعی ۱٪ افزایش می‌یابد. نمونه گیری از پرزهای کوریونی بین هفته‌های ۱۴-۱۱ حاملگی انجام می‌گیرد و طی آن سلول‌های بافت جفت جهت بررسی خارج می‌شود. احتمال سقط بعد از انجام کوریوسنتز بیشتر و حدود ۲-۱٪ بیشتر از حالت نرمال است. (۴-۱)

## تشخیص غیر تهاجمی قبل از زایمان

روش‌های تهاجمی تشخیص قبل از زایمان تا قبل از هفته ۱۱ حاملگی قابل انجام نیست و اگرچه کوریوسنتز در سه ماه اول حاملگی قابل انجام است ولی با افزایش خطر سقط جنین همراه است (۷-۵). خطرات روش‌های تهاجمی قبل از زایمان برای مادر و جنین، راه اندازی یک روش ایمن و دقیق را برای تشخیص غیر تهاجمی قبل از زایمان (NIPD:non-invasive prenatal diagnosis) ضروری می‌کند. اساس این روش‌ها بر ردیابی ماده ژنتیکی جنینی در جریان خون مادر استوار است (۸).

## DNA آزاد جنینی در خون مادر

برخلاف عقیده غالب که تصور می‌شود جفت مانند یک سد بین جریان خون مادر و جنین عمل می‌کند، Lo et al. (۱۹۹۶) در مطالعه خود جابه جایی دو طرفه سلول و اجزای آن را بین جریان خون مادر و جنین نشان داد. (۹) مطالعات بعدی نشان دادند که سلول‌های جنینی، DNA آزاد جنینی می‌توانند از جفت عبور کرده و وارد جریان خون مادر شوند. (۱۱،۱۰)

سه دیدگاه درباره منشا DNA آزاد جنینی در خون مادر وجود دارد: بافت جفت، سلول‌های جنینی و انتقال مستقیم DNA جنینی به خون مادر است. (۱۲) هر چند شواهد نشان می‌دهد که سلول‌های تروفوبلاست جنینی با بیشترین احتمال منبع DNA آزاد جنینی در خون مادر است. بعضی از این دلایل شامل ناپدید شدن سریع DNA جنینی از خون مادر پس از زایمان و خروج جفت (۱۳) قابلیت ردیابی DNA آزاد جنینی در خون مادر در هفته‌های اول حاملگی و قبل از تشکیل جریان خون جنینی- جفتی (۱۴) ردیابی DNA آزاد جنینی در حاملگی‌های بدون جنین (an embryonic pregnancy) که فقط کیسه آمنیون و سلول‌های تروفوبلاست وجود دارد ۱۵،۱۲).

بخش زیادی از DNA آزاد جنینی در جریان خون مادر، منشا مادری دارد و تنها ۱۰-۵٪ از آن مربوط به جنین است. میزان DNA آزاد جنینی در افراد مختلف متفاوت است که به تفاوت‌های بیولوژیک افراد مربوط است. DNA آزاد جنینی تقریبا از هفته هفتم حاملگی قابل تشخیص است. با افزایش سن حاملگی میزان آن افزایش می‌یابد. متوسط نیمه عمر آن در خون مادر ۱۶ دقیقه (۳۰-۴) است و به همین دلیل ۲ ساعت پس از زایمان از خون مادر قابل ردیابی نیست. نیمه عمر کوتاه DNA آزاد جنینی نشان می‌دهد که DNA جنینی به صورت دایم وارد خون مادر می‌شود و می‌تواند منبع خوبی برای انجام تست‌های تشخیص غیر تهاجمی قبل از زایمان باشد (۸، ۱۸-۱۶).

## کاربردهای بالینی استفاده از cffDNA

**تشخیص زود هنگام جنسیت جنین:** تشخیص زود هنگام جنسیت جنین برای بررسی وضعیت سلامتی جنین از نظر بیماری‌های وابسته به جنس و زنانی که در معرض داشتن نوزاد با بیماری هایپرپلازی مادر زادی آدرنال هستند از نظر بالینی سودمند است. همچنان که قبلا ذکر شد تکنیک‌های تهاجمی تشخیص قبل از زایمان تا هفته ۱۱ قابل انجام نیست و از طرفی دیگر باعث افزایش خطر سقط جنین می‌شود. تکنیک‌های معمول اولتراسونوگرافی در طول سه ماهه اول حاملگی به دلیل تکامل نا کامل قسمت‌های خارجی دستگاه تناسلی جنین قابل اعتماد نیست. با استفاده از cffDNA، بخش‌هایی از کروموزوم Y (DYS14 و SRY) در خون مادر ردیابی و جنسیت جنین تشخیص داده می‌شود (۲۱-۱۹).

**تعیین وضعیت RhD جنین:** آنتی ژن‌های Rh بر سطح

گلبول‌هـای قرمز خون قـرار دارند. آنتی ژن‌هـای مهم این گـروه شـامل E، D، c، C و e اسـت ولی آنتـی ژن D از نظـر بالینی دارای اهمیت ویژه اسـت. در زنان حامله RhD منفی که نوزاد با وضعیت RhD مثبت حمل می‌کنند، احتمال ورود آنتـی ژن‌های جنینی به خون مـادر و تولید آنتی بادی علیـه آن‌ها وجود دارد. این آنتـی بادی‌ها که از کلاس IgG هسـتند از جفت عبـور می‌کنند و گلبول‌هـای قرمز جنینی را تخریـب می‌کنند. بیمـاری همولیتیک جنینـی _ نوزادی (Hemolytic disease of the fetus and newborn) در نتیجه همولیز گلبول‌ها ایجاد می‌شـود. برای جلوگیری از ایـن وضعیت در مـادران RhD منفی، آنتـی بادی‌های ضد آنتـی ژن D(anti D immunoglobulin) در هفتـه ۲۸ حاملگـی و یک دوز نیز تا ۷۲ سـاعت پس از زایمان تزریق می‌شود. Anti D immunoglobulin سطح آنتی ژن‌های جنینی را می‌پوشـاند و از حساس شـدن سیستم ایمنی مادر نسـبت بـه این آنتی ژن‌هـا جلوگیری می‌کند. بـه کار بردن cffDNA بـرای تعییـن وضعیت RhD جنیـن در مادران RhD منفـی از نظر بالینی دارای اهمیت اسـت به این دلیل کـه از تزریق غیر ضـروری anti D immunoglobulin جلوگیـری می‌شـود. در واقـع تنها ۴۰٪ از مـادران RhD منفی، نـوزادان RhD مثبت حمل می‌کننـد و نیاز به تزریق anti D immunoglobulin دارنـد (۲۶–۲۲). کاربـرد دیگر در مادرانی اسـت که آنتی D در بدن آن‌ها ساخته شده اسـت و هنگام بارداری نیاز به انجام اقدامات تهاجمی برای پیگیری وضعیت همولیز گلبول‌های قرمز در جنین می‌باشـد. در این شرایط چنانچه با تعیین ژنوتیپ و تجسس اگزون‌های موجـود در ژن RHD، جنین فاقـد اگزون‌های مرتبط و در نتیجه ارهاش منفی تشـخیص داده شـود نیاز به پیگیری‌های بعدی نمی‌باشد.

### تشخیص زود هنگام پره اکلامسی (Preeclampsia)

همچنانکـه که قبلا بیان شـد مهم تریـن منبع cffDNA بافت جفت اسـت. مشـکلات مربـوط به حاملگـی که در ارتباط با رشـد غیر طبیعی جفت است با افزایش غیرطبیعی سـطح cffDNA در خون مادر همراه اسـت. پره اکلامسی یکـی از عوارض حاملگی اسـت که با افزایش فشـار خون مـادر (hypertension) و افزایـش سـطح پروتئین ادرار (proteinuria) بعد از هفته ۲۰ حاملگی شـناخته می‌شود. پـره اکلامسـی در کشـورهای توسـعه یافتـه ۵-۲٪ و در کشورهای در حال توسعه و با امکانات ناکافی حدود ۱۰٪ از کل حاملگی‌ها را شامل می‌شود. در صورت عدم تشخیص به موقع، پره اکلامسـی باعث افزایش ناخوشی (morbidity) و مرگ و میر (mortality) مادر و جنین می‌شود. در نتیجه نیـاز به یـک روش مطمئن و ارزان جهت بررسـی زنان در معرض خطر در اوایل حاملگی احسـاس می‌شـود (۸، ۲۷). بـرای اولیـن بـار Lo et al. (۱۹۹۹) غلظت cffDNA را در زنـان حامله با تشـخیص بالینی حاملگـی و زنان باردار طبیعی مقایسـه کرد و نتایج بررسی او افزایش غلظت ۵ برابر cffDNA را در زنان حامله با تشـخیص بالینی حاملگی را در مقایسه با زنان باردار طبیعی نشان داد (۲۸).

### تشخیص آنیوپلوییدی‌های جنینی (Fetal Aneuploidies)

آنیوپلوییـدی بـه تعـداد غیرطبیعـی کروموزوم‌ها اطلاق می‌شـود که به صورت تعداد کمتر و یا بیشتر از تعداد طبیعی در سـلول‌ها وجود دارد. هرچند بیشتر موارد آنیوپلوییدی به سقط خود به خودی منجر می‌شود، در هر ۱۰۰۰ تولد زنده ۹ مورد آنیوپلوییدی مشـاهده می‌شود (۲۹). به صورت معمول تشـخیص قبل از زایمان آنیوپلوییدی‌هـا مانند تریزومی ۲۱ (trisomy 21) بـا نمونه گیـری از پرزهای جفتی و انجام کاریوتیپ جنینی انجام می‌شـود (۳۰). مطالعات اولیه نشـان داد که مقـدار cffDNA در خون مادر وقتی جنین مبتلا به تریزومی ۲۱ و تریزومی ۱۳ باشـد افزایش می‌یابد (۳۱) ولی این افزایش در تریزومی ۱۸ مشاهده نمی‌شود (۳۲).

بـه کار بردن cffDNA برای تشـخیص قبـل از زایمان آنیوپلوییدی‌ها با چالش‌هایی همراه بوده اسـت. یکی از این مشـکلات مربوط بـه غلظت بـالای DNA آزاد مادری در مقایسه با غلظت DNA آزاد جنینی در خون مادر است. راه حل پیشنهادی برای غلبه بر این مشکل، ردیابی مولکول‌های نوکلئیک اسید اختصاصی جنین در پلاسمای مادر است. این مولکول‌ها شامل مولکول‌های نوکلییک اسید با منشا جفتی و یا مارکرهای اپی ژنتیک اختصاصی جفت است (۳۵–۳۳).

دو تکنولوژی پیشـرفته جدید که به سرعت در آزمایشگاه‌ها مـورد اسـتفاده قـرار می‌گیـرد شـامل digital PCR و massively parallel sequencing می‌باشـند. dPCR

روش جدیـدی برای تجسـس اسـیدهای نوکلئیـک و تعیین کمیت آنان اسـت. در این روش یک مولکـول میلیون‌ها برابر افزایـش یافته و با اسـتفاده از پروب نشـاندار شـده با رنگ، توالی‌هـای هـدف قابل رد یابی اسـت. ایـن روش جایگزین مناسـبی برای real time PCR از بعد حساسـیت و تعیین کمیت محسـوب می‌شود. متوسـط غلظت DNA جنینی در پلاسـمای مادران در سه ماهه اول و دوم حاملگی با استفاده از real time PCR حدود ۳ درصد و این نسـبت با اسـتفاده از dPCR حـدود ۱۰ درصـد اسـت. در واقـع ایـن روش جایگزین مناسـبی برای real time PCR از بعد حساسیت و تعیین کمیت محسـوب می‌شود و کاربرد آن برای تشخیص آنیوپلوئیدی‌هـا به جنسـیت و یا توزیع اللی وابسـته نیسـت. تکنولوژی دوم (MPS) نیز در حال حاضر در دسترس و قادر به تعیین توالی مولکول‌های DNA در پلاسمای مادر و مقایسه با یک توالی ژنوم مرجع انسانی می‌باشد. برای مثال در بارداری تریزومی ۲۱ تعداد مولکول‌های به دست آمده از کروموزوم ۲۱ در مقایسه با حالت طبیعی افزایش نشان می‌دهد.

هم اکنون MPS در آزمایشـگاه‌های تشخیص بالینی کشور آمریکا و بخشـی از کشـورهای آسـیایی جهت تشخیص غیر تهاجمـی قبل از زایمـان آنیوپلوئیدی‌های جنینـی به کار برده می‌شود (۳۶).

## نتیجه گیری

تشـخیص قبـل از تولـد بیماری‌هـای ژنتیکـی و غربال آنیوپلوئیدی‌هـا در مدیریت بـارداری و فراهم کردن فرصت تصمیـم جهت زوجیـن اهمیت بسـیار زیـادی دارد. آنالیز نوکلئیک اسید جنین در پلاسمای مادر نقش اساسی در ایجاد روش‌های تشـخیصی غیر تهاجمی بـدون خطر برای باردار و جنیـن می‌باشـد. از طرفی این روش‌ها قیمت تمام شـده بـرای اقدامات تهاجمی غیر ضـروری را کاهش خواهد داد. تا کنـون روش‌های غیر تهاجمی بـرای بیماری‌های ژنتیکی مندلی به صورت روتین در کلینیک مورد استفاده قرار نگرفته اسـت. اگر چه تلاش‌های وسـیعی توسـط محققین جهت شناسایی بیماری‌هایی چون تالاسمی در حال انجام است ولی تشـخیص آنیوپلوئیدی‌ها در برخی آزمایشگاه‌ها با استفاده از تکنولوژی‌های جدید در حال انجام اسـت. البته لازم به ذکر است که کاربرد این آزمون‌ها باید با در نظر گرفتن ملاحظات اخلاقی، اجتماعی و قانونـی انجام پذیرفته و نیاز به طراحی الگوریتم‌های خاص در این رابطه وجود دارد.

## *References*


*1- Mujezinovic, F., & Alfirevic, Z. (2007). Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villus sampling: A systematic review. Obstetrics and Gynecology, 2(110), 678–694.*

*2- Midtrimester amniocentesis for prenatal diagnosis. Safety and accuracy. JAMA, 1976;236:1471–6.*

*3- Rhoads GG, Jackson LG, Schlesselman SE, et al. The safety and efficacy of chorionic villus sampling for early prenatal diagnosis of cytogenetic abnormalities. N Engl J Med, 1989;320:609–17.*

*4- Eddleman KA, Malone FD, Sullivan L, et al. Pregnancy loss rates after midtrimester amniocentesis. Obstet Gynecol, 2006;108:1067–72.*

*5- BombardA, Akolekar R, Farkas D, et al. Fetal RHD genotype detection from circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma in non-sensitized RhD negativewomen. PrenatDiagn 2011;31: 802–808.*

*6- Swanson A, Sehnert A,Bhatt S. Non-invasive Prenatal Testing: Technologies, Clinical Assaysand Implementation Strategies*

*for Women's Healthcare Practitioners.Curr Genet Med Rep 2013;1:113–121.*

*7- Shahbazian N, Barati M, Arian P, et al. Comparison of Complications of Chorionic Villus Samplingand Amniocentesis. Int J FertilSteril 2012;5(4):241-244.*

*8- Wright, C., & Burton, H. (2009). The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. Human Reproduction Update, 15(1), 139-151.*

*9- Lo, Y. M. D., Lo, E. S., Watson, N., Noakes, L., Sargent, I. L., Thilaganathan, B., & Wainscoat, J. S. (1996). Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. Blood, 88 (11), 4390-4395.*

*10- Babochkina, T., Mergenthaler, S., De Napoli, G., Hristoskova, S., Tercanli, S.,Holzgreve, W., & Hahn, S. (2005). Numerous erythroblasts in maternal blood areimpervious to fluorescent in situ hybridization analysis, a feature related to adense compact nucleus with apoptotic character. Haematologica, 90(6), 740-745.*

*11- Bianchi, D. W., Zickwolf, G. K., Weil, G. J., Sylvester, S., & DeMaria, M. A. (1996). Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93(2), 705–708.*

*12- Alberry, M. S., & Soothill, P. W. (2008). Non-invasive prenatal diagnosis: Implications for antenatal diagnosis and management of high-risk pregnancies. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine, 13(2), 84-90.*

*13- Lo, Y. M., Zhang, J., Leung, T. N., Lau, T. K., Chang, A. M., & Hjelm, N. M. (1999c). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. American Journal of Human Genetics, 64(1), 218–224.*

*14- Rijnders, R.J., Van Der Luijt, R.B., Peters, E.D., Goeree, J.K., Van Der Schoot, C.E., Ploos Van Amstel, J.K., & Christiaens, G.C. (2003). Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma. Prenatal Diagnosis, 23, 1042–1044.*

*15- Alberry, M., Maddocks, D., Jones, M., Abdel Hadi, M., Abdel-Fattah, S., Avent, N., & Soothill, P. W. (2007). Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: Confirmation that the origin is the trophoblast. Prenatal Diagnosis, 27(5), 415-418.*

*16- Birch, L., English, C. A., O'Donoghue, K., Barigye, O., Fisk, N. M., & Keer, J. T. (2005). Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. Clinical Chemistry, 51(2), 312-320.*

*17- Redman, C.W.G. & Sargent, I.L. (2003). Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response—A review. Placenta, 2, S21-S27.*

*18- Bianchi, D. W., Maron, J. L., & Johnson, K. L. (2010). Insights into fetal and neonatal development through analysis of cell-free RNA in body fluids. Early Human Development, 86(11), 747-752.*

*19- Hill, M., Finning, K., Martin, P., Hogg, J., Meaney, C., Norbury, G., Daniels, G., & Chitty,L. (2010). Non-invasive prenatal determination of fetal sex: Translating research into clinical practice. Clinical Genetics, 19(10), 1399-0004.*

*20- Scheffer, P. G., van der Schoot, C. E., Page-Christiaens, G. C., Bossers, B., van Erp, F., de Haas, M. (2010). Reliability of fetal sex determination using maternal plasma. Obstetrics & Gynecology, 115(1), 117-126.*

*21- Bustamante-Aragones, A. C., Gonzalez-Gonzalez, C., Rodriguez de Alba, M., Ainse, E., & Ramos, C. (2010). Noninvasive prenatal diagnosis using ccffDNA in maternal blood: State of the art. Expert Review of Molecular Diagnostics, 10(2), 197-205.*

*22- Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. Transplant immunology. 2005;14(3):143-53.*

*23- Chinen, P. A., Nardozza, L. M. M., Martinhago, C. D., Camano, L., Daher, S., da Silva Pares, D. B., Minett, T., Júnior, E. A., & Moron, A. F. (2010). Noninvasive determination of fetal Rh blood group, D antigen status by cell-free DNA analysis in maternal plasma: Experience in a Brazilian population. American Journal of Perinatology, 27(10), 759-762.*

*24- Kaushansky, K., Reid, M. E., Lichtman, M. A., Kipps, T. J., Seligsohn, U., & Prchal, J. T. (2010). Williams Hematology (8th ed.). McGraw-Hill Professional Pub.*

*25- Peterec, S. M. (1995). Management of neonatal Rh disease. Clinical Perinatology, 22, 561–592.*

*26- Pilgrim, H., Lloyd-Jones, M., & Rees, A. (2007). Routine antenatal anti-D prophylaxis for RhD negative women. Health technology Assessment.*

*27- Hahn, S., Rusterholz, C., Hosli, I., Lapaire, O. (2011). Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia. Placenta, 32, 17-20.*

*28- Lo, Y. M. D., Leung, T. N., Tein, M. S., Sargent, I. L., Zhang, J., Lau, T. K., Haines, C. J., Redman, C. W. G. (1999b). Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. Clinical Chemistry, 45(2), 184-188.*

*29- Maddocks, D. G., Alberry, M.S., Attilakos, G., Madgett, T. E., Choi, K., Soothill, P. W., & Avent, N. D. (2009). The SAFE project: towards non-invasive prenatal diagnosis. Biochemical Society Transactions, 37, 460-465.*

*30- Fan, H. C., & Quake, S. R. (2010). Sensitivity of noninvasive prenatal detection of fetal aneuploidy from maternal plasma using shotgun sequencing is limited only by counting statistics. PLoS ONE, 5(5), e10439.*

*31- Lo, Y. M. D., Lau, T. K., Zhang, J., Leung, T. N., Chang, A. M., Hjelm, N. M., et al.(1999a). Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. Clinical Chemistry, 45, 1747-1751.*

*32- Wataganara, T., LeShane, E. S., Farina, A., Messerlian, G. M., Lee, T., Canick, J. A., et al. (2003). Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. Human Genetics, 112, 204-208.*

*33- Chan, K. C. A., Ding, C., Gerovassili, A., Yeung S. W., Chiu, R. W. K., Leung, T. N., Lo, Y. M. D. (2006). Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. Clinical Chemistry, 52(12), 2211-2218.*

*34- Chim, S. S. C., Y. K. Tong, Chiu, R. W. K., Lau, T. K., Leung, T. N., Chan, L. Y. S., Oudejans, C. B. M., Ding, C., & Lo, Y. M. D. (2005). Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(41), 14753 14758.*

*35- Ferrari, M , Cerrera .P,Lampasona,Galbiati S,(2015).New trends in non invasive prenatal diagnosis . Clinica Chimica Acta .*

*36- Lo Y, Shing L (2012). Non-invasive prenatal diagnosis by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA.*