

---

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

# **Screeningul prenatal non- invaziv al Sindromului Down pe baza analizei peptidomului urinar matern**

---

Doctorand: **Răzvan-Lucian JURCA**

---

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Florin STAMATIAN**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA



# CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

<b>INTRODUCERE.....</b>	<b>2</b>
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....</b>	<b>3</b>
<b>CONTRIBUȚII PERSONALE.....</b>	<b>4</b>
Studiul 1: Studiu de literatură privind detecția de biomarkeri pentru Sindromul Down utilizând spectrometria de masă.....	4
Studiul 2. Asocieri între parametrii biometrici fetalii și caracteristicile materne în screening-ul prenatal al aneuploidiilor.....	5
Studiul 3. Diferențe în proteomul urinar al mamelor purtătoare de fetești cu aneuploidii.....	6
<b>CONCLUZII GENERALE .....</b>	<b>7</b>
<b>ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE CERCETĂRII DOCTORALE .....</b>	<b>7</b>

**Cuvinte cheie: Sindrom Down; Trisomia 21; tehnici omice bazate pe spectrometrie de masă; metabolomică; screening prenatal; proteomică; biometrie fetală, ultrasonografie;**

## LISTA DE PUBLICAȚII

### Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. **Jurca RL**, Pralea IE, Iacobescu M, Rus I, Iuga CA, Stamatian F. Non-Invasive Prenatal Screening for Down Syndrome: A Review of Mass-Spectrometry-Based Approaches. *Life (Basel)* 2025; 15(5):695. doi: 10.3390/life15050695. *ISI Factor de impact JCR<sub>2025</sub> – 3.4 (studiu cuprins în capitolul 6).*
2. **Jurca RL**, Gheorghiu I, Rus I, Ormindean V, Stamatian F. Associations between fetal biometric parameters and maternal characteristics in the prenatal screening phase for aneuploidies. *Medicine and Pharmacy Reports* 2025; 98(4):475-485. doi: 10.15386/mpr-2933. *PubMed (studiu cuprins în capitolul 7).*
3. **Jurca RL**, Soporan AM, Pralea IE, Gheorghiu I, Rus I, Stamatian F, Iuga CA. Exploratory Urinary Proteomic Profiling in Pregnancies with Fetal Aneuploidies: Molecular Insights into Maternal–Fetal Metabolic Communication. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2025; 47(12): 973. doi: 10.3390/cimb47120973. *ISI Factor de impact JCR<sub>2025</sub> – 3 (studiu cuprins în capitolul 8).*

## **INTRODUCERE**

Aneuploidia fetală reprezintă o cauză majoră de pierdere a sarcinii, morbiditate și mortalitate perinatală, fiind asociată cu malformații congenitale și dizabilități pe termen lung. În prezent, screeningul prenatal se bazează pe markeri serici și ecografie, completate de metode invazive de confirmare, iar introducerea testării ADN-ului fetal liber circulant a adus un progres semnificativ, dar nu a eliminat nevoia de alternative complementare. În acest context, markerii ecografici de tip „soft markers” și analiza proteomică urinară prin spectrometrie de masă oferă oportunități inovatoare, prin abordări neinvazive, accesibile și multidimensionale, capabile să surprindă homeostazia materno-fetală și să îmbunătățească precizia screeningului prenatal. Integrarea datelor clinice cu metode moderne „-omice” deschide astfel perspective importante pentru identificarea unor biomarkeri relevanți și pentru optimizarea strategiilor de monitorizare a sarcinilor complicate cu aneuploidii.

## **STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII**

Aneuploidia fetală reprezintă una dintre cele mai importante cauze de pierderi de sarcină, malformații congenitale și morbiditate perinatală, cu impact semnificativ asupra sănătății publice. Cele mai frecvente aneuploidii compatibile cu viața sunt trisomiile 21, 18 și 13, respectiv monosomia X, fiecare având manifestări clinice și prognostice specifice. Screeningul prenatal a evoluat constant, de la metode bazate pe markeri serici materni și ecografie, către tehnologii moderne care oferă o acuratețe superioară, dar care încă nu au reușit să elimine necesitatea procedurilor invazive de diagnostic.

Markerii ecografici de tip „soft markers” joacă un rol central în evaluarea de rutină a riscului pentru aneuploidii. Aceștia nu sunt specifici, dar pot semnală discrepanțe între vârsta gestațională și parametrii biometrici, contribuind la stratificarea cazurilor ce necesită investigații suplimentare. Parametrii cranieni, circumferința abdominală și lungimea femurului sunt cei mai frecvent utilizați, iar corelarea lor cu alte semne ecografice sau cu date clinice materno crește puterea predictivă. Totodată, progresele imagistice au dus la standardizarea măsurătorilor și la creșterea reproductibilității acestora.

Pe lângă ecografie și markeri biochimici, testarea ADN-ului fetal liber circulant (NIPT) a revoluționat domeniul, demonstrând sensibilitate și specificitate ridicate pentru trisomia 21 și rezultate promițătoare și pentru alte aneuploidii. Totuși, costurile

ridicate, accesibilitatea limitată și caracterul exclusiv de screening fac ca NIPT să nu poată substitui complet diagnosticul invaziv.

În ultimii ani, dezvoltarea tehnologiilor „-omice” a deschis noi perspective pentru identificarea de biomarkeri non-invazivi. Dintre substraturile biologice investigate, urina s-a dovedit a fi un mediu promițător, având avantaje precum accesibilitatea, stabilitatea și caracterul neinvaziv al colectării. Deși literatura este dominată de studii pe sânge, lichid amniotic sau placentă, analiza proteomică urinară poate surprinde modificări moleculare la nivelul interfeței materno-fetale, relevante pentru diagnosticul precoce al aneuploidiilor.

Astfel, stadiul actual al cunoașterii evidențiază o tendință clară spre integrarea datelor clinice, ecografice și moleculare. Această abordare multidimensională are potențialul de a îmbunătăți screeningul prenatal, de a reduce necesitatea procedurilor invazive și de a contribui la personalizarea îngrijirii gravidei, oferind totodată o înțelegere mai profundă a mecanismelor patofiziologice implicate în aneuploidii

## CONTRIBUȚII PERSONALE

### **Studiul 1: Studiu de literatură privind detecția de biomarkeri pentru Sindromul Down utilizând spectrometria de masă**

**Scop / Obiective:** Scopul studiului de literatură a fost de a analiza progresele recente în utilizarea spectrometriei de masă pentru identificarea biomarkerilor asociați cu Sindromul Down (trisomia 21). Obiectivele principale au constat în: (i) evaluarea tipurilor de mostre biologice investigate (ser matern, lichid amniotic, placentă, urină); (ii) evidențierea proteinelor și metaboliților diferențial exprimați în sarcinile cu făt aneuploid; (iii) identificarea avantajelor și limitărilor tehnologiilor proteomice și metabolomice aplicate în acest domeniu.

**Material și metode:** S-a realizat o analiză a articolelor publicate în ultimele două decenii, selectate din baze de date științifice majore (ex. PubMed, Web of Science, Scopus), care au utilizat tehnici de spectrometrie de masă pentru detectarea biomarkerilor în contextul Sindromului Down. Studiile incluse au vizat atât proteomica, cât și metabolomica, folosind platforme precum LC-MS/MS, MALDI-TOF sau 2D-DIGE-MS.

**Rezultate:** Rezultatele studiilor revizuite arată un număr consistent de proteine și metaboliți modificați la gravidele purtătoare de feți cu Sindrom Down. Cele mai frecvent raportate proteine includ factori implicați în răspunsul imun ( $\alpha$ -1 antitripsină, complement C3, apolipoproteine), metabolism (transferrină, proteine legate de lipide și

carbohidrați) și stres oxidativ (superoxid dismutaza SOD1). De asemenea, analizele metabolice au evidențiat modificări în metabolismul aminoacizilor, al lipidelor și al glucozei. Totuși, deși aceste descoperiri sugerează că spectrometria de masă are potențialul de a identifica biomarkeri specifici, rezultatele sunt heterogene, iar reproducibilitatea între studii rămâne limitată, din cauza dimensiunii reduse a loturilor și a diferențelor metodologice.

**Concluzii:** Spectrometria de masă reprezintă o metodă promițătoare pentru identificarea de biomarkeri asociați cu Sindromul Down, oferind o acuratețe și o profunzime superioară tehnicilor tradiționale. Totuși, variabilitatea rezultatelor și lipsa standardizării procedurilor metodologice limitează, deocamdată, implementarea clinică. Sunt necesare studii multicentrice, cu loturi mari și protocoale unitare, pentru validarea acestor biomarkeri și pentru integrarea lor într-o strategie non-invazivă, complementar testelor actuale de screening prenatal.

## **Studiu 2. Asocieri între parametrii biometrici fetal și caracteristicile materne în screening-ul prenatal al aneuploidiilor**

**Scop / Obiective:** Scopul studiului a fost de a analiza corelațiile dintre parametrii biometrici fetal și evaluări ecografice și caracteristicile materne, în contextul screening-ului prenatal al aneuploidiilor. Obiectivele au constat în: (i) determinarea relației dintre vârsta gestațională și parametrii cranieni, abdominali și femurali ai fătului; (ii) investigarea posibilelor diferențe între sarcinile euploide și cele cu anomalii cromozomiale; (iii) evaluarea influenței unor factori materni precum vârsta, înălțimea sau creșterea ponderală asupra măsurătorilor ecografice.

**Material și metode:** Analiza s-a bazat pe o cohortă de gravide investigate ecografic în trimestrul II de sarcină. Parametrii biometrici evaluați au inclus: diametrul biparietal (BPD), circumferința craniană (HC), circumferința abdominală (AC) și lungimea femurului (FL). Datele au fost corelate cu caracteristicile materne (vârstă, înălțime, greutate și creștere ponderală), utilizând teste statistice adecvate (coeficienți de corelație Spearman, comparații între grupuri).

**Rezultate:** Rezultatele au arătat o corelație puternică și predictibilă între parametrii biometrici fetal și vârsta gestațională în sarcinile euploide (coeficienți de corelație  $>0,75$ ). În schimb, în sarcinile cu aneuploidii, această corelație a fost mult mai slabă, valorile biometrice fiind constant reduse comparativ cu lotul martor, chiar și la vârste gestaționale mai mari. De asemenea, au fost observate asocieri între caracteristicile materne și biometria fetală: înălțimea maternă și creșterea ponderală au influențat pozitiv dimensiunile fetale, sugerând că acești factori pot contribui suplimentar la evaluarea riscului de anomalie cromozomială. Parametrii precum lungimea femurului (FL) și circumferința abdominală (AC) au prezentat valori mai mici la feții cu aneuploidii, deși corelațiile nu au fost semnificative statistic la nivel individual.

**Concluzii:** Studiul confirmă valoarea biometriei fetale ca instrument în screening-ul prenatal, subliniind că discrepanțele dintre vârsta gestațională și parametrii ecografici pot ridica suspiciunea de aneuploidie. Asocierea acestor date cu factori materni relevă o perspectivă complexă și integrativă asupra riscului, care poate contribui la reducerea necesității unor teste invazive. Rezultatele obținute susțin necesitatea dezvoltării unor modele predictive ce combină markerii ecografici „soft”, caracteristicile materne și datele obținute prin metode „-omice”, în vederea creșterii acurateții screening-ului prenatal.

### **Studiul 3. Diferențe în proteomul urinar al mamei purtătoare de fete cu aneuploidii**

**Scop / Obiective:** Scopul studiului a fost de a caracteriza proteomul urinar matern și de a identifica diferențele semnificative între sarcinile cu fete euploizi și cele complicate de aneuploidii (trisomiile 21, 18, 13 și monosomia X). Obiectivele principale au inclus: (i) definirea profilului proteomic urinar global în sarcină; (ii) identificarea proteinelor diferențial exprimate (DEPs) între grupuri; (iii) explorarea posibilelor funcții biologice și a relevanței clinice a acestor proteine ca potențiali biomarkeri non-invazivi.

**Material și metode:** Au fost analizate probe de urină provenind de la gravide investigate în trimestrul I-II. Pregătirea probelor a inclus precipitare proteică, digestie enzimatică și purificare a peptidelor, urmată de analiză prin nano-LC-IMS-MS pe platforma SYNAPT G2-Si. Identificarea și cuantificarea proteinelor s-a realizat utilizând baza de date UniProtKB/Swiss-Prot Human, cu un prag FDR <1%. Analiza statistică a inclus normalizarea datelor, testarea diferențelor ( $p \leq 0,05$ ;  $|\text{fold change}| \geq 1,2$ ), PCA și reprezentări grafice (volcano plot, heatmap).

**Rezultate:** Un total de 861 proteine urinare au fost identificate, dintre care 42 s-au dovedit semnificativ diferențial exprimate între grupuri. Analiza PCA a evidențiat o separare clară între mamele cu fete euploizi și cele cu fete aneuploizi, PC1 explicând 32,9% din variația totală.

– Proteine supraexprimate la mamele cu aneuploidii au inclus TFF1/TFF3 (protecție mucosală, integritate epitelială), KRT76 (citoprotecție și funcție placentară), AZGP1 (metabolism lipidic), MAT1 (reglare epigenetică), FBLN1 și FGA (remodelare tisulară, coagulare), PVR și CD300 (imunomodulare).  
– Proteine subexprimate au fost asociate cu imunitatea, metabolismul, citoscheletul și reglarea proteazelor (ex. SERPINA4/5, ROBO4, YWHAZ, HRG, PGK1). Compararea cu proteomul urinar de referință (Zhao et al., 2017) a arătat o suprapunere de ~81%, restul de proteine fiind potențial specifice sarcinii și aneuploidiilor.

**Concluzii:** Rezultatele demonstrează că proteomul urinar matern reflectă alterări imunologice, metabolice și structurale asociate cu aneuploidiile fetale. Identificarea unui set de proteine diferențial exprimate susține potențialul urinii ca substrat neinvaziv pentru screening și monitorizarea sarcinilor cu risc. Integrarea acestor biomarkeri cu datele ecografice și caracteristicile materne ar putea duce la dezvoltarea unor modele predictive mai sensibile și mai puțin invazive, contribuind la îmbunătățirea screening-ului prenatal.

## CONCLUZII GENERALE

Rezultatele obținute confirmă importanța markerilor ecografici de tip „soft markers” în screeningul prenatal, aceștia având valoare orientativă în estimarea riscului de aneuploidie, mai ales atunci când sunt analizați în clustere și corelați cu vârsta gestațională.

Analiza proteomică urinară a evidențiat diferențe semnificative între sarcinile euploide și cele aneuploide, implicând proteine cu rol în imunitate, metabolism, remodelare vasculară și răspuns la stres. Aceste descoperiri susțin potențialul urinei ca sursă de biomarkeri neinvazivi, complementari markerilor ecografici și serici utilizați în prezent.

De asemenea, revizuirea literaturii de specialitate a sintetizat cunoștințele actuale și a plasat studiile și rezultatele obținute în context internațional.

Integrarea datelor ecografice cu analiza proteomică poate conduce la dezvoltarea unor algoritmi multiparametrici de screening, capabili să îmbunătățească acuratețea diagnostică, să reducă numărul de proceduri invazive și să ofere o abordare personalizată în îngrijirea prenatală.

## ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE CERCETĂRII DOCTORALE

Originalitatea cercetării prezentate în această teză derivă din mai multe aspecte complementare, care conferă caracter inovator atât designului, cât și rezultatelor obținute.

În primul rând, urina reprezintă un substrat biologic non-invaziv, stabil și ușor de colectat, dar foarte puțin explorat până în prezent în contextul identificării de biomarkeri pentru aneuploidii fetale. Majoritatea studiilor publicate s-au concentrat pe sânge, lichid amniotic sau țesut placentar, lăsând deschisă direcția de cercetare asupra proteomului urinar. Analiza proteomică efectuată în cadrul prezentei lucrări aduce date noi, evidențiind atât un profil comun cu proteomul urinar de referință, cât și un set de

proteine exclusiv identificate în grupul de gravide cu feți aneuploizi, ceea ce susține potențialul acestui tip de analiză ca metodă complementară în screeningul prenatal.

În al doilea rând, asocierea dintre parametrii biofetalii ecografici și caracteristicile materne (vârstă, înălțime, câștig ponderal, suplimentare cu acid folic etc.) reprezintă o abordare originală, neexplorată anterior în literatura de specialitate. Această corelare permite o înțelegere mai nuanțată a factorilor care influențează atât creșterea și dezvoltarea fetală, cât și riscul de aneuploidie, sugerând posibilitatea definirii unor clustere complexe de markeri clinici și imagistici care să reducă necesitatea testărilor invazive.

Nu în ultimul rând, integrarea datelor obținute prin proteomica urinară cu observațiile clinice și ecografice oferă o viziune multidimensională asupra sarcinii complicate cu aneuploidii. Rezultatele obținute contribuie nu doar la consolidarea cunoștințelor privind rolul biomarkerilor non-invazivi, ci și la deschiderea unor noi perspective de cercetare, orientate spre personalizarea strategiilor de screening și monitorizare prenatală. În plus, demonstrarea fezabilității integrării clinice a metodelor „-omice” în practica obstetricală conturează un pas esențial spre translatarea cercetării fundamentale în beneficii concrete pentru pacientă și făt.

---

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

# **Non-invasive prenatal screening of Down's Syndrome based on maternal urinary peptidome analysis**

---

PhD Candidate: **Răzvan-Lucian JURCA**

---

PhD Supervisor: **Prof. Dr. Florin STAMATIAN**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## **CONTENTS OF THE DOCTORAL THESIS**

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>12</b>
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE.....</b>	<b>12</b>
<b>PERSONAL CONTRIBUTIONS.....</b>	<b>13</b>
Study 1: Literature Review on the Detection of Biomarkers for Down Syndrome Using Mass Spectrometry.....	13
Study 2: Associations between Fetal Biometric Parameters and Maternal Characteristics in Prenatal Screening for Aneuploidies.....	14
Study 3: Differences in the Urinary Proteome of Mothers Carrying Fetuses with Aneuploidies.....	15
<b>GENERAL CONCLUSIONS.....</b>	<b>16</b>
<b>ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE DOCTORAL RESEARCH.....</b>	<b>16</b>

**Key words: Down syndrome; Trisomy 21; mass-spectrometry-based omics; metabolomics; prenatal screening; proteomics; fetal biometry, ultrasonography;**

## LIST OF PUBLICATIONS

### Full-length articles published as a result of the doctoral research

1. **Jurca RL**, Pralea IE, Iacobescu M, Rus I, Iuga CA, Stamatian F. Non-Invasive Prenatal Screening for Down Syndrome: A Review of Mass-Spectrometry-Based Approaches. *Life (Basel)* 2025; 15(5):695. doi: 10.3390/life15050695. *ISI Factor de impact JCR<sub>2025</sub> – 3.4 (studiu cuprins în capitolul 6).*
2. **Jurca RL**, Gheorghiu I, Rus I, Ormindean V, Stamatian F. Associations between fetal biometric parameters and maternal characteristics in the prenatal screening phase for aneuploidies. *Medicine and Pharmacy Reports* 2025; 98(4):475-485. doi: 10.15386/mpr-2933. *PubMed (studiu cuprins în capitolul 7).*
3. **Jurca RL**, Soporan AM, Pralea IE, Gheorghiu I, Rus I, Stamatian F, Iuga CA. Exploratory Urinary Proteomic Profiling in Pregnancies with Fetal Aneuploidies: Molecular Insights into Maternal–Fetal Metabolic Communication. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2025; 47(12): 973. doi: 10.3390/cimb47120973. *ISI Factor de impact JCR<sub>2025</sub> – 3 (studiu cuprins în capitolul 8).*

## INTRODUCTION

Fetal aneuploidy represents a major cause of pregnancy loss, perinatal morbidity, and mortality, being associated with congenital malformations and long-term disabilities. Currently, prenatal screening relies on serum markers and ultrasound, complemented by invasive confirmatory methods. The introduction of cell-free fetal DNA testing has brought significant progress but has not eliminated the need for complementary alternatives. In this context, ultrasound “soft markers” and urinary proteomic analysis through mass spectrometry provide innovative opportunities, offering non-invasive, accessible, and multidimensional approaches capable of capturing maternal–fetal homeostasis and improving the accuracy of prenatal screening. The integration of clinical data with modern “-omics” methods thus opens important perspectives for identifying relevant biomarkers and optimizing monitoring strategies for pregnancies complicated by aneuploidies.

## CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Fetal aneuploidy is one of the leading causes of pregnancy loss, congenital malformations, and perinatal morbidity, with a significant impact on public health. The most frequent aneuploidies compatible with life are trisomies 21, 18, and 13, as well as monosomy X, each with distinct clinical features and prognostic implications. Prenatal screening has evolved steadily, from approaches based on maternal serum markers and ultrasound to modern technologies offering higher accuracy, yet still unable to eliminate the need for invasive diagnostic procedures.

Ultrasound “soft markers” play a central role in the routine assessment of aneuploidy risk. Although nonspecific, they can signal discrepancies between gestational age and biometric parameters, thus contributing to the stratification of cases requiring further investigation. Cranial parameters, abdominal circumference, and femur length are the most frequently used, and their correlation with other ultrasound findings or maternal clinical data increases predictive power. Advances in imaging have further contributed to the standardization of measurements and improved reproducibility.

In addition to ultrasound and biochemical markers, non-invasive prenatal testing (NIPT) using cell-free fetal DNA has revolutionized the field, demonstrating high

sensitivity and specificity for trisomy 21 and promising results for other aneuploidies. However, its high cost, limited accessibility, and exclusive role as a screening tool mean that NIPT cannot fully replace invasive diagnosis.

In recent years, the development of “omics” technologies has opened new perspectives for identifying non-invasive biomarkers. Among the biological substrates investigated, urine has emerged as a promising medium, offering advantages such as accessibility, stability, and non-invasive collection. Although the literature is dominated by studies on blood, amniotic fluid, or placental tissue, urinary proteomic analysis can capture molecular changes at the maternal–fetal interface, which may be relevant for the early diagnosis of aneuploidies.

Thus, the current state of knowledge highlights a clear trend toward integrating clinical, ultrasound, and molecular data. This multidimensional approach has the potential to improve prenatal screening, reduce the need for invasive procedures, and contribute to the personalization of maternal care, while also providing deeper insights into the pathophysiological mechanisms underlying aneuploidies.

## PERSONAL CONTRIBUTIONS

### ***Study 1: Literature Review on the Detection of Biomarkers for Down Syndrome Using Mass Spectrometry***

**Aim / Objectives:** The aim of this literature review was to analyze recent advances in the use of mass spectrometry for the identification of biomarkers associated with Down syndrome (trisomy 21). The main objectives were: (i) to evaluate the types of biological samples investigated (maternal serum, amniotic fluid, placenta, urine); (ii) to highlight differentially expressed proteins and metabolites in pregnancies with aneuploid fetuses; (iii) to identify the advantages and limitations of proteomic and metabolomic technologies applied in this field.

**Materials and Methods:** A comprehensive review of articles published over the past two decades was performed, selected from major scientific databases (e.g., PubMed, Web of Science, Scopus), which applied mass spectrometry–based techniques for biomarker detection in the context of Down syndrome. Included studies focused on both proteomics and metabolomics, employing platforms such as LC-MS/MS, MALDI-TOF, or 2D-DIGE-MS.

**Results:** The reviewed studies reported a consistent set of altered proteins and metabolites in pregnant women carrying fetuses with Down syndrome. The most frequently described proteins included factors involved in immune response ( $\alpha$ -1 antitrypsin, complement C3, apolipoproteins), metabolism (transferrin, lipid- and

carbohydrate-binding proteins), and oxidative stress (superoxide dismutase SOD1). Metabolomic analyses further revealed disruptions in amino acid, lipid, and glucose metabolism. Despite these promising findings suggesting that mass spectrometry has the potential to identify specific biomarkers, the results remain heterogeneous, and inter-study reproducibility is limited due to small sample sizes and methodological differences.

**Conclusions:** Mass spectrometry represents a promising tool for the identification of biomarkers associated with Down syndrome, providing superior accuracy and depth compared with traditional techniques. However, variability of results and the lack of methodological standardization currently restrict its clinical implementation. Multicenter studies with larger cohorts and standardized protocols are required to validate these biomarkers and enable their integration into a non-invasive strategy complementary to current prenatal screening methods.

### ***Study 2: Associations between Fetal Biometric Parameters and Maternal Characteristics in Prenatal Screening for Aneuploidies***

**Aim / Objectives:** The aim of this study was to analyze correlations between ultrasound-evaluated fetal biometric parameters and maternal characteristics in the context of prenatal screening for aneuploidies. The objectives were: (i) to determine the relationship between gestational age and fetal cranial, abdominal, and femoral parameters; (ii) to investigate potential differences between euploid and aneuploid pregnancies; and (iii) to evaluate the influence of maternal factors such as age, height, and weight gain on ultrasound measurements.

**Materials and Methods:** The analysis was based on a cohort of pregnant women evaluated by second-trimester ultrasound. The biometric parameters included biparietal diameter (BPD), head circumference (HC), abdominal circumference (AC), and femur length (FL). These data were correlated with maternal characteristics (age, height, weight, and gestational weight gain) using appropriate statistical methods (Spearman correlation coefficients, group comparisons).

**Results:** Findings demonstrated a strong and predictable correlation between fetal biometric parameters and gestational age in euploid pregnancies (correlation coefficients  $>0.75$ ). In contrast, in pregnancies with aneuploidies, this correlation was markedly weaker, with consistently reduced biometric values compared to controls, even at higher gestational ages. Associations between maternal characteristics and fetal biometry were also observed: maternal height and weight gain positively influenced fetal dimensions, suggesting their additional contribution to chromosomal anomaly risk assessment. Parameters such as femur length (FL) and abdominal circumference (AC) showed smaller values in aneuploid fetuses, although these individual correlations did not reach statistical significance.

**Conclusions:** This study confirms the value of fetal biometry as a tool in prenatal screening, emphasizing that discrepancies between gestational age and ultrasound parameters may raise suspicion of aneuploidy. The integration of maternal factors provides a more complex and holistic perspective on risk assessment, which could reduce the need for invasive testing. The results support the development of predictive models combining ultrasound soft markers, maternal characteristics, and omics-derived data to enhance the accuracy of prenatal screening.

### ***Study 3: Differences in the Urinary Proteome of Mothers Carrying Fetuses with Aneuploidies***

**Aim and Objectives:** The aim of this study was to characterize the maternal urinary proteome and identify significant differences between pregnancies with euploid fetuses and those complicated by aneuploidies (trisomies 21, 18, 13, and monosomy X). The main objectives were: (i) to define the global urinary proteome profile during pregnancy; (ii) to identify differentially expressed proteins (DEPs) between groups; (iii) to explore the biological functions and clinical relevance of these proteins as potential non-invasive biomarkers.

**Materials and Methods:** Urine samples were collected from pregnant women in the first and second trimester. Sample preparation included protein precipitation, enzymatic digestion, and peptide purification, followed by analysis using nano-LC-IMS-MS on a SYNAPT G2-Si platform. Protein identification and quantification were performed against the UniProtKB/Swiss-Prot Human database, with an FDR threshold of <1%. Statistical analysis included data normalization, differential expression testing ( $p \leq 0.05$ ; |fold change|  $\geq 1.2$ ), PCA, and graphical representations (volcano plot, heatmap).

**Results:** A total of 861 urinary proteins were identified, of which 42 were significantly differentially expressed between groups. PCA revealed a clear separation between mothers with euploid and aneuploid fetuses, with PC1 alone explaining 32.9% of total variance.

– Upregulated proteins in mothers with aneuploid pregnancies included TFF1/TFF3 (mucosal protection, epithelial integrity), KRT76 (cytoprotection and placental function), AZGP1 (lipid metabolism), MAT1 (epigenetic regulation), FBLN1 and FGA (tissue remodeling, coagulation), as well as PVR and CD300 (immune modulation).  
– Downregulated proteins were associated with immunity, metabolism, cytoskeleton, and protease regulation (e.g., SERPINA4/5, ROBO4, YWHAZ, HRG, PGK1). Comparison with the reference urinary proteome (Zhao et al., 2017) showed ~81% overlap, with the remaining proteins potentially specific to pregnancy and aneuploidy.

**Conclusions:** The results demonstrate that the maternal urinary proteome reflects immunological, metabolic, and structural alterations associated with fetal aneuploidies. The identification of a panel of DEPs supports the potential of urine as a non-invasive substrate for screening and monitoring high-risk pregnancies. Integrating these biomarkers with ultrasound data and maternal characteristics may lead to more sensitive, less invasive predictive models, thus improving prenatal screening.

## GENERAL CONCLUSIONS

The results obtained confirm the importance of ultrasound soft markers in prenatal screening, as they provide valuable guidance in estimating the risk of aneuploidy, particularly when analyzed in clusters and correlated with gestational age. Urinary proteomic analysis revealed significant differences between euploid and aneuploid pregnancies, involving proteins with roles in immunity, metabolism, vascular remodeling, and stress response. These findings support the potential of urine as a source of non-invasive biomarkers, complementary to the ultrasound and serum markers currently used. In addition, the review of the scientific literature synthesized the current body of knowledge and placed the findings of this research within an international context. The integration of ultrasound data with proteomic analysis may enable the development of multiparametric screening algorithms capable of improving diagnostic accuracy, reducing the number of invasive procedures, and providing a personalized approach to prenatal care.

## ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE DOCTORAL RESEARCH

The originality of the research presented in this thesis derives from several complementary aspects that confer innovative value both to its design and to the results obtained.

First, urine represents a non-invasive, stable, and easily accessible biological substrate that has been minimally explored so far in the search for biomarkers of fetal aneuploidy. Most published studies have focused on blood, amniotic fluid, or placental tissue, leaving urinary proteomics as an open research avenue. The proteomic analysis carried out in this work provides novel data, highlighting both a shared profile with the reference urinary proteome and a distinct set of proteins identified exclusively in the group of mothers carrying aneuploid fetuses, supporting the potential of this approach as a complementary method in prenatal screening.

Second, the association between fetal ultrasound biometric parameters and maternal characteristics (age, height, weight gain, folic acid supplementation, etc.) represents an original approach not previously reported in the literature. This correlation enables a more nuanced understanding of the factors influencing both fetal growth and development and the risk of aneuploidy, suggesting the possibility of defining complex clusters of clinical and imaging markers that may reduce the need for invasive testing.

Finally, the integration of urinary proteomics with clinical and ultrasound findings provides a multidimensional perspective on pregnancies complicated by aneuploidy. The results contribute not only to consolidating knowledge on the role of non-invasive biomarkers but also to opening new research directions oriented toward personalized strategies for prenatal screening and monitoring. Moreover, demonstrating the feasibility of clinically integrating omics methodologies in obstetric practice represents a crucial step toward translating fundamental research into tangible benefits for both mother and fetus.