

## **Agradecimentos**

Ao Senhor Professor Doutor José Barros e à Senhora Dr<sup>a</sup>. Ana Filipa Ferreira.

À minha família, em especial aos meus irmãos Pedro, Beatriz e Martim.

Aos meus amigos.

## Índice

Resumo .....	3
Abstract .....	5
Introdução .....	7
Materiais e métodos .....	10
Resultados .....	12
Mecanismos e fatores celulares.....	13
Invasão trofoblástica.....	13
Angiogénese .....	17
<i>Stress</i> celular.....	24
Disfunção endotelial .....	26
Morfologia placentária e hemodinâmica.....	32
Morfologia placentária .....	32
Hemodinâmica placentária .....	33
Hemodinâmica materna.....	36
Discussão .....	39
Referências bibliográficas.....	44

## **Resumo**

*Introdução:* A Pré-eclampsia (PE) afeta 5% das gravidezes e é uma das principais causas de parto pré-termo iatrogénico e morbidade e mortalidade maternas e neonatais. Apresenta grande variabilidade clínica e prognóstica, o que poderá indicar a existência de uma grande heterogeneidade na fisiopatologia subjacente, com diferentes vias que culminam numa mesma patologia. Deste modo, surgiram os conceitos de PE precoce e tardia, consideradas entidades distintas e resultantes de diferentes vias fisiopatológicas.

*Objetivo:* Analisar as diferentes vias fisiopatológicas que poderão estar na origem do desenvolvimento da PE precoce e tardia, permitindo uma identificação mais precoce dos casos e uma abordagem mais direcionada, com a possibilidade de prevenção e tratamentos mais específicos, com impacto prognóstico.

*Materiais e métodos:* Foi executada uma pesquisa na PUBMED e na CLINICALKEY e selecionados os estudos que comparassem a pré-eclampsia precoce e tardia em termos fisiopatológicos, nomeadamente mecanismos e fatores celulares e morfologia placentária e hemodinâmica.

*Resultados:* Verificou-se que a PE precoce resulta de um compromisso da placentação por deficiente invasão trofoblástica e desregulação da angiogénese, como consequência da interação de fatores imunológicos e genéticos não totalmente conhecidos. Na PE tardia verificou-se a existência de um subgrupo semelhante à PE precoce, em que existe compromisso vascular, e um subgrupo resultante de maior suscetibilidade metabólica ou inflamatória maternas, particularmente se associada a uma unidade feto-placentária aumentada. Fenómenos de hipóxia e

stress oxidativo estão associados à libertação sistémica de partículas que poderão estar na origem da disfunção endotelial, presente em ambas as entidades, e que desencadeia alterações hemodinâmicas, dando origem à clínica materna.

*Discussão/conclusão:* As vias fisiopatológicas da PE precoce e tardia ainda não estão completamente esclarecidas mas, de um modo geral, a natureza heterogénea da doença parece resultar do culminar de diferentes graus de contribuição materna e feto-placentária. Na PE precoce existe um compromisso feto-placentário preponderante enquanto que na PE tardia, existindo grande suscetibilidade materna, a PE desenvolve-se mesmo com ligeiro compromisso vascular.

**Palavras-chave:** pré-eclampsia precoce; pré-eclampsia tardia; fisiopatologia; placentação; biomarcadores; disfunção endotelial.

## **Abstract**

*Introduction:* Preeclampsia (PE) occurs in 5% of all pregnancies and is a leading cause of iatrogenic preterm birth and pregnancy-related morbidity and mortality. PE's clinical features and outcome are highly variable and relate to the great heterogeneity in its pathogenesis causing it to appear through multiple pathways. Bearing this in mind, the concepts of early-onset and late-onset preeclampsia have emerged, characterizing preeclampsia into two disease entities with different etiologies and therefore different clinical expression.

*Objective:* To analyze the pathways thought to be associated with the development of early and late-onset PE as it allows early diagnosis, personalized approaches and more effective preventative and therapeutic management, optimizing the prognosis.

*Materials and methods:* A PUBMED and CLINICALKEY research was performed and studies comparing the pathogenesis of early and late-onset PE were selected, particularly those regarding cellular mechanisms and factors and placental morphology and hemodynamics.

*Results:* Early-onset PE is characterized by an abnormal placentation due to an incomplete trophoblast invasion and altered angiogenic factor balance. This occurs as a consequence of the interaction between immunological and genetic factors that are yet to be fully understood. Late-onset PE is also associated with the placenta, as seen in early-onset PE but, moreover, it relates to a metabolic and inflammatory maternal susceptibility, particularly when associated with an overgrown fetoplacental unit. Hypoxia and oxidative stress are related to the systemic shedding of microparticles thought to lead to endothelial dysfunction, which is characteristic of both early

and late-onset PE and might play a role in the hemodynamic changes that give rise to the maternal clinical features.

*Discussion/conclusion:* The etiopathogenesis of early and late-onset PE remains to be a subject of extensive research. So far, it is believed that the heterogeneous nature of the disease is consistent with varying degrees of contribution from the mother and the fetoplacental unit. In early-onset PE there is severe placental dysfunction, whereas in late-onset PE the women with extensive predisposing sensitivity can develop PE even if with very little vascular abnormalities.

**Keywords:** early-onset preeclampsia; late-onset preeclampsia; pathophysiology; placentation; biomarkers; endothelial dysfunction.

## Introdução

A pré-eclampsia (PE) é uma doença específica da gravidez e é classicamente definida como o aparecimento de hipertensão [Tensão Arterial (TA)  $\geq$  140/90mmHg] e proteinúria  $>300\text{mg}/24\text{h}$ , após as 20 semanas de gestação, numa mulher previamente normotensa.<sup>1,2</sup> Surge em cerca de 5% das gravidezes a nível mundial e 1,4% das gravidezes em Portugal, sendo uma das principais causas de parto pré-termo iatrogénico, bem como de morbilidade e mortalidade maternas e neonatais. É responsável por 7,5% dos partos pré-termo e 3,3% dos recém nascidos de baixo peso em Portugal, bem como cerca de 76000 mortes maternas e 500000 mortes fetais em todo o mundo, anualmente.<sup>1,3,4,5</sup> O diagnóstico é dificultado pela grande variabilidade de apresentações clínicas, podendo existir casos em que, apesar da patologia, a grávida se apresenta assintomática.<sup>3</sup>

Fisiologicamente, no início da gravidez, as células do sinciciotrofoblasto invadem a decídua e parte do miométrio e substituem o músculo liso e tecido elástico das artérias espiraladas maternas por um material fibrinoide (placentação). Desta forma, estas artérias são convertidas em vasos de maior capacitância e menor resistência, assegurando a manutenção do fluxo sanguíneo para a placenta e para o feto.<sup>1,6</sup>

A fisiopatologia da PE ainda não está completamente esclarecida. No entanto, defeitos no processo de placentação parecem estar implicados. A apoptose das células do sinciciotrofoblasto e a sua reduzida capacidade invasora comprometem a remodelação das artérias, culminando em hipoperfusão placentária e isquémia.<sup>6</sup> No entanto, a reduzida perfusão placentária não é uma condição suficiente para o desenvolvimento da PE, existindo outras patologias, como a restrição

de crescimento intrauterino (RCIU), que partilham esta via fisiopatológica. Contrariamente à RCIU, na PE são ativadas respostas inflamatórias e vasculares maternas— síndrome materna<sup>1,3,7</sup>—mediadas por uma cascata de mecanismos efetores secundários, que incluem a desregulação dos fatores angiogénicos, o stress oxidativo e a disfunção endotelial e imunológica.<sup>2</sup> Desta forma, a fisiopatologia da PE é geralmente explicada segundo um modelo em dois estádios (*two-stage model*), em que a isquémia placentária (estádio 1) leva à produção de fatores que desencadeiam as manifestações clínicas maternas (estádio 2).<sup>8</sup>

Numa tentativa de estratificação de risco, inicialmente classificou-se a PE em moderada ou grave, tendo por base valores quantitativos de tensão arterial e proteinúria.<sup>9</sup> No entanto, em 1995, Dekker *et al.* relacionaram os achados clínicos e laboratoriais da PE com a idade gestacional de instalação da patologia. Deste modo, definiram PE precoce como a que surge antes das 34 semanas e PE tardia como a que surge a partir das 34 semanas.<sup>10</sup> Esta classificação parece ser a que melhor traduzirá a gravidade de apresentação e o prognóstico materno e neonatal.<sup>9</sup> A PE precoce apresenta um pior prognóstico materno, estando associada a maior mortalidade, maior risco cardiovascular e maior probabilidade de recorrência. O prognóstico perinatal está também comprometido, com uma taxa de mortalidade fetal 6 vezes superior à da PE tardia e de morbilidade neonatal 16 vezes superior.<sup>11</sup> Pelo contrário, a PE tardia, que corresponde a 93% dos casos, está associada a uma clínica menos exuberante, um menor comprometimento do crescimento fetal e resultados maternos e perinatais mais favoráveis.<sup>10,12</sup>

Recentemente, a PE precoce e tardia foram consideradas entidades diferentes, resultando de diferentes vias fisiopatológicas.<sup>9</sup> As alterações na placentação são mais comumente observáveis em casos de PE precoce enquanto que a PE tardia estará mais relacionada com



fatores de suscetibilidade materna.<sup>12</sup> O objetivo desta revisão é fazer uma abordagem qualitativa do máximo de informação científica relativamente à fisiopatologia da PE precoce e tardia, de modo a identificar os pontos de divergência entre elas. Esta distinção permitirá justificar a variabilidade clínica apresentada pela PE e identificar potenciais biomarcadores, assim como alvos preventivos ou terapêuticos específicos, com impacto prognóstico.

## **Materiais e métodos**

Foi realizada uma pesquisa na PUBMED com os termos MeSH “Preeclampsia/physiopathology” e as palavras-chave “Early onset preeclampsia” e “Late onset preeclampsia”, complementada por uma pesquisa na CLINICAL KEY, com as mesmas palavras chaves. Esta pesquisa forneceu 214 referência entre 2001 e 2015. Em ambas as pesquisas foram apenas fornecidos estudos na língua inglesa, com exceção de um artigo da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. Foram ainda selecionados das várias listas de referências estudos considerados relevantes e atuais. Entre estes, foram selecionados estudos de investigação básica e estudos clínicos de caso-controle e coorte, realizados em humanos, perfazendo um total de 79 referências. Foram também consultadas as guidelines “Task force on Hypertension in Pregnancy” do *American College of Obstetricians and Gynecologists*. Todos os estudos selecionados comparam diretamente a PE precoce e tardia, com exceção de 6 artigos especificamente sobre PE precoce e 5 artigos sobre PE tardia. Foram ainda selecionados dois artigos que comparam a PE com a RCIU. Efetuou-se uma análise qualitativa da bibliografia pesquisada. Todas as referências foram obtidas com base na sua disponibilidade *online* ou através do sistema da Biblioteca Central dos HUC. Contudo, todos os artigos citados na bibliografia mais atual foram incluídos.

Os estudos analisados consideraram PE como hipertensão (TA > 140/90mmHg) e proteinúria >300mg/24h, após as 20 semanas de gestação e definiram RCIU como peso ao nascimento inferior ao percentil 10 para a idade gestacional. A PE precoce foi considerada aquela que ocorre antes das 34 semanas e PE tardia a que ocorre após as 34 semanas. Nos estudos caso-controle, o grupo de controles corresponde a grávidas sem patologia e o grupo investigacional a grávidas com PE precoce ou tardia, conforme discriminado na descrição do estudo.

No que concerne aos principais métodos descritos pela literatura selecionada, a avaliação dos diversos biomarcadores foi realizada através do doseamento sérico materno ao longo da gravidez, o estudo da hemodinâmica placentária foi feito através de ecografia Doppler e a avaliação morfológica através do estudo histopatológico da placenta, após o parto. Outros métodos mais específicos são explicados individualmente nos respectivos estudos.

## **Resultados**

Nesta revisão optou-se por apresentar os resultados consoante a área fisiopatológica abordada. Deste modo, fez-se a comparação da PE precoce e tardia tendo em conta mecanismos e fatores celulares e morfologia placentária e hemodinâmica. Os “mecanismos e fatores celulares” referem-se às diferenças na concentração de fatores com produção placentária e sua libertação para a circulação materna, às diferentes vias de stress e morte celular e apoptose, bem como desencadeadores imunológicos e genéticos. A “morfologia e hemodinâmica placentária” inclui estudos histopatológicos placentários, estudos de eco-Doppler das artérias uterinas e estudos hemodinâmicos maternos. Optou-se por esta abordagem uma vez que, dada a falta de clareza na fisiopatologia da PE, nem toda a literatura abrange as várias áreas em simultâneo. Deste modo, serão maioritariamente abordados estudos referentes a cada uma destas áreas individualmente. No entanto, ainda que em menor número, também foram incluídos os estudos existentes que conjugam estas áreas, numa visão mais abrangente das várias vias fisiopatológicas potencialmente implicadas.

## Mecanismos e fatores celulares

### Invasão trofoblástica

A invasão trofoblástica das artérias espiraladas maternas é um dos pilares da fisiopatologia da PE e depende da interação entre o trofoblasto e a matriz extracelular. A prostasina, uma serina protease identificada como supressora da invasão em várias neoplasias, parece estar envolvida na PE como supressora da invasão trofoblástica e da remodelação do tecido endometrial. Yang *et al.*<sup>13</sup> verificaram que existe uma maior expressão de prostasina nos tecidos placentários na PE, particularmente na PE precoce. Ao mimetizar este aumento, através da administração de prostasina recombinante humana, observaram uma diminuição da capacidade de invasão e migração das células trofoblásticas. Associado ao aumento da prostasina, verificou-se uma diminuição das metaloproteinases MMP2 e MMP9, que têm um efeito regulador da invasão celular. Desta forma, ao atenuar a ação da prostasina pela administração do seu anticorpo, verificou-se um aumento destas metaloproteinases, sugerindo que a prostasina tem um efeito inibidor sobre elas, inibindo a sua secreção e suprimindo a invasão trofoblástica.<sup>13</sup>

A invasão trofoblástica incompleta também poderá estar relacionada com os fatores de crescimento semelhantes à insulina, que se sabe terem ação ao nível da proliferação e diferenciação das células do trofoblasto. Esta adaptação celular está na dependência do IGF-1 (*insulin growth factor-1*) e do seu ligando IGFBP-1 (*insulin growth factor binding protein-1*), que inibe o IGF-1 quando deteta uma situação de nutrição fetal comprometida. Deste modo, a diminuição do IGF-1 e o aumento do IGFBP-1 estão associados a situações de restrição de crescimento, secundárias a um aporte sanguíneo deficiente. Como a PE precoce está muitas vezes relacionada com fetos pequenos para a idade gestacional, Vatten *et al.*<sup>14</sup> colocaram a

hipótese de existir uma desregulação destes fatores nesta patologia, comprometendo a placentação. Recolheram sangue do cordão umbilical de 258 grávidas com PE e 609 controles e dosearam o IGF-1 e o IGFBP-1. Verificaram que nos casos graves de PE, com instalação precoce da clínica, ocorreu um aumento do IGFBP-1 e uma diminuição do IGF-1, em comparação com os controles. Por outro lado, nos casos de PE tardia, com clínica moderada, não se detetaram alterações significativas nestes marcadores. De igual forma, observaram que na PE precoce existe uma inibição direta do IGF-1, comprometendo a invasão trofoblástica e, deste modo, comprometendo o desenvolvimento fetal. Esta hipótese é também suportada pelo facto de nos casos de baixo peso fetal sem causa placentária não se verificar diminuição do IGF-1. Pelo contrário, não existe associação estatisticamente significativa entre a PE e o aumento do IGFBP-1, concluindo-se que este aumento ocorre secundariamente à nutrição fetal comprometida pela placentação deficitária, restringindo o crescimento como forma de diminuir as necessidades fetais.<sup>14</sup>

A PP-13 (*placental protein 13*) é uma proteína expressa a nível do sinciciotrofoblasto e que, com base em estudos em animais, se pensa ter uma ação vasodilatadora e na remodelação das artérias uterinas. Encontra-se reduzida em casos de PE grave, que correspondem maioritariamente a casos de PE precoce, e esta redução é considerada a indicação mais precoce de desenvolvimento da PE.<sup>15</sup> Através do doseamento da PP-13 no primeiro trimestre, Nicolaides *et al.*<sup>16</sup> previram o desenvolvimento de PE precoce em 80% dos casos e, ao associar este doseamento ao estudo Doppler das artérias uterinas, obtiveram taxas de deteção de 90%.<sup>16</sup> Spencer *et al.*<sup>17</sup> estudaram a probabilidade de desenvolver PE com base nos valores de PAPP-A (*pregnancy-associated plasma protein A*), no primeiro trimestre da gravidez. Concluíram que o valor médio de PAPP-A nos casos de PE é inferior ao doseado em gravidezes normais (0,772 *versus* 1,0431,  $p < 0,001$ ) e

quanto mais baixo o valor desta proteína, maior a probabilidade de desenvolver a doença, independentemente de se tratar de PE precoce ou tardia.<sup>17</sup> Deste modo, é possível que na PE tardia também exista compromisso placentário, não estando esclarecido qual o seu grau de gravidade e se todos os casos de PE tardia terão a mesma etiologia.

A via de sinalização do Notch parece ser importante para a correta placentação, pela sua ação na determinação e diferenciação celular. Deste modo, Zhao *et al.*<sup>18</sup> compararam a expressão das proteínas da família do Notch em casos de PE precoce e gravidezes normais, colocando a hipótese de existir uma menor expressão destas proteínas na PE. Através de imunohistoquímica, observaram que todos os recetores e ligandos desta família têm expressão placentária e que os seus perfis de distribuição são semelhantes nos casos e nos controles, com predomínio de expressão a nível do citotrofoblasto. No entanto, em casos de PE precoce, a expressão do RNAm e da proteína do Notch2 estavam diminuídas. Por outro lado, verificou-se um aumento da proteína do Notch3, um resultado discordante com a hipótese inicial mas de elevada reprodutibilidade.<sup>18</sup> Fragdiadaki *et al.*<sup>19</sup>, com base nas mesmas premissas, realizaram um estudo semelhante ao de Zhao *et al.*, mas compararam a expressão das proteínas da família do Notch em grávidas com PE tardia e em grávidas sem patologia. Contrariamente aos resultados anteriores, não observaram expressão placentária do Notch1, Notch4 e do ligando DLL1 (*delta-like ligand 1*). Porém, e de acordo com a hipótese colocada, verificaram uma menor expressão de todos os outros recetores, ligandos e genes alvo desta família, particularmente do Notch 2 e Notch 3. As discrepâncias observadas relativamente a este último recetor poderão ser justificadas pela diferente idade gestacional de instalação da patologia, nestes estudos.<sup>19</sup> Deste modo, conclui-se que esta via de sinalização poderá ter impacto na fisiopatologia da PE, com particular destaque

para o Notch2 e Notch3.<sup>18,19</sup> Uma das causas consideradas para a repressão desta via de sinalização é a metilação do ligando do Notch 1, DLL-1. Através da análise do DNA fetal livre, verificou-se que este ligando se encontra metilado em 61% dos casos de PE precoce mas apenas em 5% dos casos de PE tardia, pelo que esta alteração poderá ser uma causa de imaturidade placentária, existente apenas na PE precoce. Esta hipótese é também suportada pelo aumento da metilação deste ligando em casos de abortamento, em que a imaturidade placentária é a causa subjacente.<sup>20</sup>

Outra razão proposta para a placentação anormal é uma reduzida interação imunológica entre a mãe e o feto, o que justifica o facto de a PE ser mais comum em primíparas do que em múltiparas, pois após uma gravidez normal as adaptações imunológicas permaneceriam efetivas e protegeriam as gravidezes subsequentes.<sup>8,21</sup> No entanto, a ausência de proteção imunológica não justifica o maior risco de recorrência da PE precoce, em comparação com a tardia.<sup>21,22</sup> A PE precoce desenvolve-se a partir de fatores de risco crónicos, como fatores genéticos ou ambientais, enquanto que na PE tardia os fatores de risco são transitórios, como uma gravidez gemelar ou macrossómica. Deste modo, a maior recorrência da PE precoce poderá estar relacionada com a persistência dos fatores de risco, ao contrário do que acontece na tardia.<sup>23</sup> Quanto à gravidade da recorrência, Zhang *et al.*<sup>22</sup> concluíram que quanto mais precoce a instalação da PE na primeira gravidez maior a tendência para existir uma instalação precoce nas gravidezes subsequentes, enquanto que Van Rijn *et al.*<sup>21</sup> não verificaram esta relação. Por outro lado, observaram que a grande maioria das recorrências tem clínica moderada e está associada a bom prognóstico, o que pode ser justificado por uma invasão trofoblástica mais suave, após a modificação das artérias espiraladas na primeira gravidez.<sup>23</sup>



Numa gravidez normal, para que não exista rejeição imunológica, o sistema imune materno tem de desenvolver tolerância ao feto. Essa tolerância resulta da supressão das células citotóxicas T e NK (*natural killer*) pelas células T reguladoras. Deste modo, existe um aumento das células T reguladoras durante a gravidez, atingindo o pico durante o segundo trimestre e depois diminuindo até ao parto. Na PE existe uma desregulação imunológica, com diminuição das células T reguladoras e consequente aumento da citotoxicidade local. Quinn *et al.*<sup>24</sup> calcularam a percentagem de células T reguladoras na decídua, em casos de PE precoce e tardia e tentaram correlacionar esses achados com outros parâmetros de disfunção placentária. Observaram uma diminuição das células T reguladoras na PE precoce, relativamente à PE tardia e aos controles que, por sua vez, não apresentavam diferenças entre eles. As células T citotóxicas estavam aumentadas nos casos de PE grave. Deste modo, concluíram que o defeito imunoregulador detetado na PE se deve aos casos de PE precoce, em que existe uma atividade citotóxica local descontrolada que culmina em dano vascular e trofoblástico.<sup>24</sup>

### **Angiogénese**

A invasão trofoblástica e o desenvolvimento inicial da placenta ocorrem num ambiente relativamente hipóxico porque a circulação feto-placentária ainda não se encontra bem estabelecida. Este ambiente interfere na ação de enzimas dependentes de oxigénio que, ao detetarem um ambiente hipóxico, estimulam a libertação de fatores angiogénicos, eritropoetina e HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ), que contribuem para o desenvolvimento da placenta.<sup>25,26</sup> Khodzhaeva *et al.*<sup>25</sup> dosearam a concentração de HIF- $\alpha$  em grávidas com PE e concluíram que se encontra diminuído na PE precoce, mas aumentado na PE tardia. Assim, existe uma falha nos mecanismos de compensação da hipóxia na PE precoce, pois existe uma desregulação nas

enzimas sensíveis ao oxigênio, que não detetam a hipóxia e, conseqüentemente, não estimulam a produção de HIF-1 $\alpha$ . Na PE tardia não existe alteração destas enzimas, pelo que a hipóxia é compensada e dá-se o normal desenvolvimento da placenta.<sup>25,26</sup>

A família do VEGF (*vascular endothelial growth factor*) é reconhecida pela sua importância na regulação das adaptações vasculares placentárias.<sup>7</sup> Deste modo, são vários os estudos realizados no sentido de averiguar o papel destes fatores angiogénicos e as conseqüências da sua desregulação. De entre os vários fatores pertencentes a esta família destacam-se o VEGF livre e o PlGF (*placental growth factor*), ambos com ação pró-angiogénica e o sFLT-1 (*soluble fms-like tyrosine kinase 1*), com ação antiangiogénica.

Comparativamente à gravidez normal, na PE verifica-se um aumento da concentração plasmática média de sFLT-1 e uma diminuição na concentração de PlGF, em particular nas cinco semanas que antecedem o desenvolvimento da clínica.<sup>27,28</sup> Estas variações são mais significativas no casos precoces de doença, verificando-se uma concentração de sFLT-1 43 vezes superior ao normal e uma concentração de PlGF 21 vezes inferior ao normal. Já nos casos tardios, o sFLT-1 sofre um aumento de 3 vezes e o PlGF uma diminuição de 5 vezes.<sup>29</sup> Quanto ao sFLT-1, verifica-se também a existência de uma correlação positiva com o grau de proteinúria ( $r=0,4$ ;  $p=0,002$ ), bem como uma correlação negativa com idade gestacional de aparecimento da PE ( $r=-0,5$ ;  $p<0,001$ ), a idade gestacional aquando do parto ( $r=-0,5$ ;  $p<0,001$ ), e o peso ao nascimento ( $r=-0,6$ ;  $p<0,001$ ).<sup>27</sup> Foi proposto que a diminuição do PlGF esteja relacionada com a sua ligação ao sFLT-1, e não a uma diminuição placentária, pelo que os seus valores são inversamente proporcionais.<sup>30</sup> No entanto, em doseamentos realizados no primeiro trimestre, verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa do PlGF, sem aumento estatisticamente significativo de

sFLT-1.<sup>31</sup> Deste modo, se a diminuição do PIGF ocorre mais precocemente, deverá colocar-se a hipótese de existirem outras causas para esta diminuição para além da ligação ao sFLT-1. Tendo em conta que os doseamentos isolados de sFLT-1 e PIGF apresentam maior discrepância face aos controlos na PE precoce, também o rácio sFLT-1/PIGF apresentará uma diferença mais significativa na PE precoce do que na PE tardia.<sup>30</sup> Segundo Verlohren *et al.*<sup>32</sup>, este rácio apresenta um maior poder preditivo do que os doseamentos isolados dos fatores, em particular nos casos de PE precoce, onde se verificou maior sensibilidade e especificidade diagnóstica.<sup>32</sup>

Crispi *et al.*<sup>33</sup> apresentaram resultados sobreponíveis, no entanto concluíram que estas variações ocorrem de igual forma nos casos de RCIU e, por conseguinte, nenhum destes marcadores permite distinguir PE e RCIU. Deste modo, conclui-se que a PE e a RCIU são mediadas pela placenta e partilham importantes semelhanças, mas ainda não está esclarecido qual o fator que determina a existência de uma ou outra entidade.<sup>33</sup>

Apesar de não pertencer à família do VEGF, a endoglina solúvel (sEng), em combinação com o PIGF e o sFLT-1, pode ser útil na previsão da PE. A endoglina participa na regulação da vasodilatação dependente do óxido nítrico, pelo que a sua expressão se encontra aumentada em tecidos onde ocorra angiogénese. Por sua vez, a endoglina solúvel resulta de uma reação proteolítica sobre a endoglina, comprometendo a capacidade angiogénica dos tecidos.<sup>7</sup> Nos quadros de PE, a endoglina solúvel está aumentada causando aumento da permeabilidade vascular e hipertensão. Este aumento é tanto maior quanto mais precoce for a instalação da PE. Por outro lado, a sua ação é potenciada pelo sFLT-1, que também sofre um aumento considerável em casos de PE precoce, amplificando a disfunção vascular.<sup>34</sup> Deste modo, esta via

poderá ser uma das justificações para que a PE precoce se traduza num quadro clínico mais grave do que a PE tardia.

A activina-A encontra-se aumentada em casos de PE mas, ao contrário do verificado para outros biomarcadores, apresenta uma maior variação nos casos de PE tardia.<sup>35</sup> O seu papel ainda não está bem esclarecido mas, segundo Jenkin *et al.*<sup>36</sup>, será um marcador de *stress* fetal que aumenta em resposta a situações agudas ou crónicas de hipóxia. No entanto, estes estudos demonstraram maiores aumentos de activina-A quanto mais precoce fosse a instalação da PE.<sup>36</sup> Este aumento da activina-A poderá estar relacionado com alterações ao nível dos seus recetores, nomeadamente os recetores IIA. Ferreira *et al.*<sup>37</sup> estudaram o gene responsável pela codificação destes recetores (ACVR2A) e verificaram que na PE precoce, mas não na tardia, existem polimorfismos neste gene que comprometem a sua ação, impedindo a ligação da activina-A aos seus recetores. Deste modo, verifica-se a existência de uma base genética na fisiopatologia da PE precoce, mas não na PE tardia.<sup>37</sup>

Segundo alguns autores<sup>38,39</sup>, também a PE tardia apresenta situações em que ocorre disfunção vascular e compromisso placentário, verificando-se que, mesmo excluindo os casos de RCIU, as lesões placentárias vasculares são mais comuns nos casos de PE tardia do que nas grávidas sem patologia (33% *versus* 7,8%).<sup>39</sup> Considerando que o baixo peso ao nascimento é uma tradução da disfunção placentária, observa-se uma distribuição bimodal dos casos de PE tardia, o que significa que apesar de não ser o único fator responsável, existem casos em que existe compromisso vascular.<sup>38</sup> Soto *et al.*<sup>39</sup> realizaram um estudo transversal em que compararam os biomarcadores PlGF, sEng, sFLT-1 e sVEGFR-2 (*vascular endothelial growth factor receptor type 2*) em grávidas com PE tardia e lesões placentárias no estudo histológico, compatíveis com

compromisso vascular, e em grávidas com PE tardia mas sem estas lesões. Independentemente de existirem ou não lesões placentárias, nos casos de PE tardia verificou-se um aumento da sEng e do sFLT-1, bem como uma diminuição do PIGF e dos rácios PIGF/ sFLT-1 e PIGF/sEng. Ainda assim, nos casos em que estavam presentes lesões placentárias, as variações nestes biomarcadores foram mais marcadas, apesar de apenas a redução do PIGF e dos rácios PIGF/ sFLT-1 e PIGF/sEng terem sido estatisticamente significativas. Com base nestes resultados, Soto *et al.* concluíram que a PE tardia está mais relacionada com uma diminuição dos fatores angiogénicos do que com um aumento dos fatores antiangiogénicos, ao contrário do observado na PE precoce, e possivelmente como consequência de uma resposta à hipóxia crónica. No que diz respeito ao VEGFR-2, um fator antiangiogénico, observou-se uma diminuição apenas nos casos de PE tardia em que não existiam lesões vasculares. Esta alteração foi interpretada pelos autores como uma evidência de inflamação sistémica, sem envolvimento placentário, consistente com a hipótese de existirem outros fatores para além dos placentários na fisiopatologia da PE tardia<sup>39</sup>.

Masuyama *et al.*<sup>40</sup> colocaram a hipótese de um índice de massa corporal (IMC) elevado aumentar o risco de desenvolver PE. Deste modo, compararam os níveis de sFLT-1, PIGF e sEng na PE precoce e tardia, em mulheres com peso normal e com excesso de peso ou obesidade (IMC  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>). Nos casos de PE precoce não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos valores destes fatores angiogénicos, entre mulheres com peso normal ou com excesso de peso. Porém, nas grávidas com PE tardia, verificou-se que aquelas que tinham excesso de peso apresentavam um menor aumento de sFLT-1 e sEng e uma menor diminuição de PIGF, em comparação com grávidas de IMC normal. Assim, concluíram que na PE tardia uma ligeira desregulação nos fatores angiogénicos é suficiente para desencadear a doença em grávidas

com IMC acima do normal, pelo que a obesidade poderá ser um fator de risco para a PE tardia. Já na PE precoce, as alterações angiogénicas são mais marcadas e não parecem ser influenciadas pelo peso.<sup>40</sup>

A placentação incompleta resulta numa redução das propriedades vasodilatadoras, mediada por uma diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO: *nitric oxide*) e lesão tecidual local causada pela acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS). Tal ocorre porque a função vascular é mediada pela ação direta das ROS e pela sua interferência sobre o óxido nítrico. Por um lado, as espécies reativas de oxigénio estimulam a adesão e agregação plaquetárias, levando a uma coagulopatia intravascular que causa enfarte placentário e compromisso da circulação. Por outro lado, o aumento da produção de ROS suprime a expressão e função do NO e leva à formação de peroxinitrito, que causa lesão direta por acumulação nos tecidos placentários. Estes mecanismos levam a uma neovascularização desordenada que culmina em hipóxia placentária.<sup>41</sup>

Escudero *et al.*<sup>42</sup> estudaram a hipótese de as alterações na via  $A_{2A}AR/NO/VEGF$  ( $A_{2A}$  *adenosine receptor/ nitric oxide/ vascular endothelial growth factor*) serem o mecanismo na base dos diferentes processos angiogénicos que ocorrem na gravidez normal e com PE. A adenosina participa na angiogénese através da ativação dos seus recetores placentários (AR), que levam a uma maior síntese endometrial de NO, maior expressão de VEGF e, conseqüentemente, maior proliferação e migração das células endometriais, o que se traduz num efeito pró-angiogénico. Deste modo, realizaram um estudo caso-controle a 45 grávidas, entre as quais 8 apresentavam PE precoce e 10 apresentavam PE tardia. Após o parto, foram isoladas células endoteliais da veia umbilical e foi avaliada a resposta proliferativa a agonistas e antagonistas dos recetores da adenosina. Verificou-se que na PE precoce existe uma redução da expressão dos  $A_{2A}AR$  ( $83 \pm 6$  % de redução) , com diminuição do NO, do VEGF e da proliferação e migração celular. Por

outro lado, na PE tardia mantém-se a ativação desta via, com uma proliferação celular elevada. Nos casos tardios, ao fazer-se a administração de um antagonista dos A<sub>2A</sub>AR há diminuição da expressão de NO e VEGF enquanto que nos casos precoces, após administração de um agonista, há aumento na expressão dos mesmos. Estes resultados permitem inferir sobre o papel pró-angiogénico da adenosina na proliferação das células endoteliais.<sup>42</sup> Contrariamente, Salsoso *et al.*<sup>43</sup> verificaram uma diminuição da expressão dos recetores A<sub>2A</sub>AR na PE tardia, mas um aumento compensatório da velocidade e capacidade de transporte da L-arginina, substrato da eNOS (*endothelial nitric oxide synthetase*), com maior expressão desta enzima. No entanto, e apesar da maior produção de eNOS, a concentração de óxido nítrico está diminuída, possivelmente por inativação secundária à fosforilação da enzima de síntese.<sup>43</sup> Esta inativação pode ser explicada pela presença do polimorfismo G844T no gene de síntese da eNOS, responsável pela reação de inativação e contribuindo para a disfunção endotelial e menor capacidade de relaxamento vascular da unidade feto-placentária. Este polimorfismo é mais frequente nos casos de PE tardia, corroborando a hipótese de Salsoso *et al.* Na PE precoce, é mais prevalente o polimorfismo VNTR b/a, responsável pela menor síntese de eNOS. Deste modo, tanto nos casos precoces como nos tardios, existe uma diminuição do óxido nítrico, através de uma menor produção de eNOS nos casos precoces ou através da inativação da enzima nos casos tardios.<sup>44</sup> Necessitando da ativação dos recetores A<sub>2A</sub>AR, também a insulina participa no transporte da L-arginina. Nos casos de PE tardia, a insulina revelou ter a capacidade de corrigir as alterações no transporte da L-arginina, revertendo a disfunção endotelial feto-placentária e permitindo o relaxamento vascular através do NO. Deste modo, a modulação dos recetores A<sub>2A</sub>AR, promovendo a sua ativação, permite a atuação protetora da insulina.<sup>43</sup>

A trombofilia materna é um fator de risco major para PE, através do compromisso da circulação na unidade feto-placentária. Deste modo, polimorfismos nos genes que são responsáveis pela hemostase, como o fator V de Leiden, a protrombina e o MTHFR (metilenotetrahidrofolato redutase), podem ser causadores de PE. Ao comparar a frequência de polimorfismos conhecidos nestes genes, Salimi *et al.*<sup>45</sup> observaram uma associação entre estes polimorfismos e o desenvolvimento de PE precoce, mas não de PE tardia. Estes resultados estão de acordo com as hipóteses de que na PE precoce a circulação placentária está comprometida, enquanto que na PE tardia a hemodinâmica placentária é normal.<sup>45</sup>

### ***Stress celular***

O *stress* oxidativo, já referido como causador de apoptose placentária e libertação de mediadores inflamatórios para a circulação materna, está intimamente relacionado com o *stress* do retículo endoplasmático (RE), frequentemente partilhando a mesma etiologia. Na PE, pensa-se que a má perfusão placentária causa alterações na homeostasia, desencadeando estes mecanismos de *stress*, que ativam várias vias compensatórias de sinalização que, ao falharem na restauração da homeostasia, culminam em apoptose.<sup>46</sup> O *stress* do retículo endoplasmático leva à ativação de três vias preferenciais, coletivamente chamadas de resposta das proteínas enoveladas (*UPR - unfolded protein response*). Yung *et al.*<sup>47</sup> estudaram diferentes vias de sinalização induzidas por *stress* placentário e tentaram comprovar a hipótese de que a PE precoce tem origem placentária e a tardia tem origem em síndromes metabólicas ou de hipersensibilidade endotelial. Na PE precoce, verificou-se uma maior ativação das vias da UPR e a morfologia placentária revelou dilatação das cisternas do retículo endoplasmático, o que sugere um maior grau de *stress* induzido pelo RE. Já a PE tardia não apresentou, a este nível, diferenças estatisticamente



significativas face aos controles. Comprovada a existência de *stress* placentário induzido pelo RE, foi necessário esclarecer a causa. Para tal, foram realizadas culturas celulares em diferentes graus de hipóxia-reoxigenação e culturas com citocinas pró-inflamatórias. Observou-se uma grande ativação das vias da UPR em situações de hipóxia-reoxigenação, enquanto que nas culturas celulares com citocinas a ativação foi apenas moderada. Deste modo, concluiu-se que o *stress* placentário faz parte da fisiopatologia da PE e não é uma consequência da resposta inflamatória materna. É uma resposta à quebra da homeostasia, causada por fenómenos de hipóxia-reoxigenação consequentes a uma placentação incompleta, e ocorre predominantemente em quadros de PE precoce, o que comprova a sua origem placentária. A inexistência desta ativação na PE tardia sugere que esta deriva de causas não placentárias, podendo ser o resultado de uma hipersensibilidade à atividade inflamatória típica da gravidez.<sup>47</sup> Em 2015, Fu *et al.*<sup>48</sup> corroboraram estes estudos e identificaram as vias da UPR envolvidas. Observaram um aumento da expressão dos marcadores de *stress* do RE nos casos de PE precoce, particularmente dos marcadores da via PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*). Para além da apoptose placentária, a ativação destas vias comprometerá o desenvolvimento e função placentárias, quer por diminuição da proliferação celular quer pela ativação de vias inflamatórias, que irão contribuir para a ativação das células endoteliais maternas.<sup>48</sup>

A HtrA1 (*high temperature requirement A1*) é uma serina protease produzida a nível placentário e que protege as células de condições de *stress* como inflamação, *stress* oxidativo, hipóxia/reperfusão ou cancro. No decorrer de uma gestação normal, há um aumento progressivo da concentração desta protease, pelo que se sugere que contribua para o normal desenvolvimento da placenta. Teoh *et al.*<sup>49</sup> determinaram os valores séricos maternos de HtrA1, tendo verificado que existe uma perturbação da HtrA1 na PE. No entanto, comparativamente aos controles, na PE

precoce observou-se uma maior concentração de HtrA1 e na PE tardia observou-se uma menor concentração. Tendo em conta a função protetora da HtrA1, é possível que o seu aumento na PE precoce seja uma resposta compensatória à ativação das vias de *stress* placentário, que não se encontram ativadas na PE tardia.<sup>49</sup>

A resposta ao stress celular leva à produção de Hsp70 (*heat shock protein 70*), que estimula a libertação de citocinas pró-inflamatórias, que causam disfunção endotelial. Peraçoli *et al.*<sup>50</sup> compararam as concentrações de Hsp 70, citocinas pró-inflamatórias [TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor-alpha*), IL1 (*interleukin 1*), IL12 (*interleukin 12*)] e marcadores hepáticos e renais em casos de PE precoce e tardia. Na PE precoce observaram-se maiores concentrações de todos eles, estabelecendo-se uma correlação positiva entre a Hsp70 e o TNF- $\alpha$  ( $r=0,5$ ;  $p=0,01$ ), a IL1 ( $r=0,6$ ;  $p=0,0001$ ), a IL12 ( $r=0,3$ ;  $p=0,05$ ), a TGO (*glutamic oxaloacetic transaminase*) ( $r=0,3$ ;  $p=0,03$ ), a TGP (*glutamic pyruvic transaminase*) ( $r=0,5$ ;  $p=0,0002$ ), o LDH (*lactate dehydrogenase*) ( $r=0,4$ ;  $p=0,004$ ) e o ácido úrico ( $r=0,4$ ;  $p=0,001$ ). Deste modo, na PE precoce existe maior stress celular do que na PE tardia, traduzido pela produção de Hsp70, que desencadeia uma resposta inflamatória, com consequências hepáticas e renais maternas.<sup>50</sup>

### **Disfunção endotelial**

Para tentar compreender a relação entre o excesso de peso e a PE tardia, D'Anna *et al.*<sup>51</sup> compararam os valores de adiponectina e de resistência à insulina em casos de PE precoce e tardia. No primeiro trimestre, nos casos de PE tardia verificou-se uma hipoadiponectinémia, correlacionada e possivelmente consequente a um aumento da resistência à insulina e maior IMC da grávida. Na PE precoce, os valores de adiponectina e resistência à insulina não foram significativamente diferentes dos controles. No terceiro trimestre da gravidez, nos casos de PE tardia, observou-se um aumento da adiponectina, ainda que em menor grau nos casos de excesso

de peso, mas neste período já não se verificou a existência de correlação com a resistência à insulina, estando outros fatores envolvidos neste aumento.<sup>51</sup> De acordo com Masuyama *et al.*, a adiponectina poderá ter uma função reguladora da disfunção endotelial, pelo que este aumento poderá ser uma resposta fisiológica compensatória, face à disfunção endotelial materna. No mesmo estudo, também se observou o papel da leptina no desenvolvimento da PE, tendo-se verificado que na PE precoce existe um aumento estatisticamente significativo da leptina, que se sabe ser produzida em resposta à hipóxia, o que realça a relação da PE precoce com compromisso vascular.<sup>40</sup> Deste modo, verifica-se que a PE tardia resulta de um comprometimento metabólico, evidente desde o primeiro trimestre e que se traduz em IMC elevado, aumento da resistência à insulina e hipoadiponectinémia. Pelo contrário, a PE precoce não resulta de alterações metabólicas, mas sim de um compromisso vascular e consequente hipóxia placentária. Considerando estes mecanismos, a via comum à PE precoce e tardia seria a disfunção endotelial, com origem vascular no caso da precoce e origem metabólica no caso da tardia.<sup>51</sup> Mais recentemente, Masuyama *et al.*<sup>52</sup> colocaram a hipótese da hiperadiponectinémia, observada no terceiro trimestre de gravidezes com PE, ser consequência de uma interação com o BNP (*brain natriuretic peptide*). Numa gravidez normal não existe aumento do BNP mas, em casos de PE, verificou-se um aumento deste peptídeo, acompanhado de um aumento da adiponectina. Neste estudo, identificou-se a existência de uma correlação positiva significativa entre o BNP e a adiponectina ( $r=0,78$ ,  $p<0,001$ ), mas não se verificou a existência de correlação com a leptina, pelo que foi sugerida a existência de uma interação apenas entre o BNP e a adiponectina na PE. Esta correlação foi observável tanto em grávidas com IMC normal como naquelas com excesso de peso, embora a correlação apresentasse diferentes coeficientes de regressão. Assim, é possível que existam diferentes níveis de resposta ao BNP consoante o IMC

da grávida. Nas grávidas com excesso de peso, apesar de um igual aumento de BNP, verificou-se um menor aumento de adiponectina, em comparação com grávidas de peso normal. Deste modo, através de culturas de tecido adiposo, concluiu-se que em grávidas com excesso de peso o BNP tem menor efeito na expressão do RNAm (*RNA mensageiro*) e na secreção de adiponectina, levando a concentrações inferiores desta adipocina. Por outro lado, esta menor resposta ao BNP no excesso de peso poderá ser responsável por um aumento da resistência à insulina, o que causa disfunção endotelial, contribuindo para o desenvolvimento da PE.<sup>52</sup>

A PE partilha vários fatores de risco com a síndrome metabólica, entre os quais a resistência à insulina e o estado inflamatório sistémico, que contribuem para a disfunção endotelial, característica de ambas as patologias. Dadas estas semelhanças, foi colocada a hipótese de a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal, implicada na síndrome metabólica, estar também patente na fisiopatologia da PE. Este eixo é regulado pela coceptina, um peptídeo co-sintetizado com a vasopressina e que reflete a sua concentração sérica, sendo um indicador de *stress* individual e, conseqüentemente, marcador prognóstico em várias patologias. Deste modo, Zulfikaroglu *et al.*<sup>53</sup> e Tuten *et al.*<sup>54</sup> dosearam a coceptina sérica em gravidezes normais e com PE, tendo observado uma concentração mais elevada nos casos de patologia, particularmente nos casos de PE precoce, traduzindo uma situação de maior *stress* individual, ou seja, mais grave. Por outro lado, enquanto que Zulfikaroglu *et al.*<sup>53</sup> observaram concentrações mais elevadas de coceptina em grávidas com anormalidades do Doppler da artéria uterina, Tuten *et al.*<sup>54</sup> não verificaram a existência desta correlação, pelo que a influência da coceptina na função das células endoteliais se mantém controversa.<sup>53,54</sup>

Numa gravidez normal, a placenta liberta para a circulação materna micropartículas derivadas do sinciotrofoblasto (STBM), sendo uma resposta fisiológica de *turnover* celular. Por sua vez, na PE existe um aumento da libertação destas partículas, que não são eficazmente removidas pelos macrófagos e são, por isso, transferidas em excesso para a circulação materna.<sup>55</sup> Pensa-se que a alternância de períodos de hipóxia e reoxigenação no espaço interviloso, típico da PE, desencadeie fenómenos de *stress* oxidativo e aumente a apoptose e necrose placentárias, com consequente aumento da libertação destas micropartículas.<sup>30</sup> Tanto na PE como na RCIU existem casos que resultam de uma placentação incompleta, associada a hipóxia. No entanto, a PE está associada a uma síndrome materna, que está ausente nos casos de RCIU normotensiva. Deste modo, Goswamina *et al.*<sup>56</sup> tentaram compreender qual a razão de não existir síndrome materna nos casos de RCIU, colocando duas hipóteses fundamentais: ou não há aumento de STBM ou existe uma diferente resposta imune materna, em que as células endoteliais são capazes de responder eficazmente a esta condição. Foram feitos doseamentos de STBM em casos de PE, RCIU e controles, tendo-se observado que apenas na PE existe aumento das micropartículas, comprovando a sua ação na síndrome materna da PE. Concluiu-se, deste modo, que estas micropartículas apresentam atividade biológica e interagem com as células maternas levando a disfunção endotelial e resposta inflamatória sistémica.<sup>56</sup> Yu Chen *et al.*<sup>55</sup> tentaram compreender as diferenças na libertação destas micropartículas em casos de PE precoce e tardia. Para tal, dosearam o STBM em circulação e a caspase-3, interveniente na cascata da apoptose. Observaram que as partículas em circulação e a caspase-3 ativa atingiam concentrações superiores na PE relativamente aos controles, existindo uma correlação positiva entre ambas. No entanto, na PE precoce observou-se maior quantidade de STBM que na tardia, enquanto que o valor de caspase-3 não apresentou diferenças estatisticamente significativas. Ainda não está

esclarecido o mecanismo que leva à existência de maior quantidade de micropartículas para o mesmo ritmo de apoptose mas poderá estar relacionado com um mecanismo não apoptótico, como a necrose, que também desencadeie a patologia.<sup>55</sup> Mais recentemente foi colocada a hipótese que para além do número de partículas, também o seu tamanho contribui para a síndrome materna.<sup>57</sup> As partículas de maiores dimensões, os exossomas, têm uma função predominantemente imunorreguladora, e pensa-se que será este o tipo de partículas libertado numa gravidez normal. Na PE, pensa-se que exista aumento da libertação de microvesículas, com funções pró-inflamatórias, pró-coagulantes e antiangiogénicas. Deste modo, a síndrome materna desenvolver-se-á à custa do aumento destas partículas de menores dimensões. Por outro lado, diferentes proporções destas partículas poderão ser responsáveis pela diferente apresentação entre PE precoce e tardia.<sup>57,58</sup>

A disfunção endotelial pode ser avaliada através da vasodilatação mediada pelo fluxo, na artéria braquial. Através de eco-Doppler é avaliada a diferença de diâmetro da artéria braquial no estado basal e após colapsar a artéria com a braçadeira do esfigmomanómetro. Ao cessar o colapso há um aumento do fluxo sanguíneo que estimula o endotélio a produzir vasodilatadores, pelo que é esperado um maior diâmetro arterial.<sup>59</sup> Em situações de disfunção endotelial, a capacidade dilatadora dos vasos está comprometida, o que aumenta o risco cardiovascular.<sup>60</sup> Mori *et al.*<sup>59</sup> e Brandão *et al.*<sup>61</sup> avaliaram a função endotelial através deste método e verificaram que o fluxo mediado pela artéria braquial se encontra diminuído nos casos de PE precoce e tardia, sem diferenças entre elas.<sup>61</sup> Deste modo, concluíram que na PE, independentemente de ser precoce ou tardia, o endotélio é disfuncional. Após o parto, na PE tardia verificou-se uma melhoria da função endotelial, que normalizou ao fim de três meses. Por sua vez, na PE precoce, apesar de

existir uma melhoria da função endotelial não existe normalização da mesma, o que justifica o maior risco cardiovascular futuro nos casos precoces de PE.<sup>59</sup>

## Morfologia placentária e hemodinâmica

### Morfologia placentária

Através da comparação da morfologia placentária, Egbor *et al.*<sup>62</sup> e Van der Merwe *et al.*<sup>63</sup> corroboraram a hipótese de existir uma etiologia placentária para a PE precoce e um distúrbio materno na PE tardia. Na PE precoce observou-se uma placenta de pequenas dimensões, na maioria dos casos com peso inferior ao percentil 10, redução do volume do espaço intervilo e do volume e área de superfície das vilosidades terminais e mais áreas enfartadas, em comparação com os casos tardios. Por sua vez, na PE tardia, as dimensões placentárias não foram significativamente diferentes dos controles, existindo uma influência mínima na morfologia vascular e das vilosidades, observando-se apenas um menor volume das vilosidades-tronco.<sup>62</sup> No entanto, e apesar das numerosas alterações histológicas, nenhuma apresenta sensibilidade e especificidade suficiente para fazer a distinção entre PE precoce e tardia.<sup>64</sup>

Como observado para os marcadores angiogênicos, também a morfologia placentária não permite a distinção entre RCIU e PE precoce. Em ambas as entidades verificou-se a presença de alterações na macroscopia e histologia placentárias, que refletem um fluxo utero-placentário anormal, comprovado pelo Doppler das artérias uterinas. O estudo histológico revelou necrose fibrinóide das artérias espiraladas bem como hipovascularização, enfarte e fibrose das vilosidades. No entanto, o valor preditivo destas lesões foi cerca de 10%, pelo que a gravidade das lesões histológicas tem uma associação fraca à gravidade clínica. Por outro lado, os casos tardios de PE e RCIU representam um grupo mais heterogêneo. De um modo geral, verificou-se um menor grau de hipoplasia vilosa, arteriopatia decidual e áreas enfartadas mas, num subgrupo de 30%, observaram-se lesões compatíveis com baixa perfusão que, por razões desconhecidas, se



manifesta mais tardiamente.<sup>64</sup> Com o objetivo de melhorar o valor preditivo das lesões histológicas, foram identificados cinco parâmetros morfológicos de elevada significância: número de vilosidades, área, perímetro e diâmetro das vilosidades e *index* de capilarização. Cumulativamente, estes parâmetros foram capazes de explicar até 98% da variabilidade encontrada entre casos de PE e gravidezes normais.<sup>65</sup>

Ogge *et al.*<sup>66</sup> tentaram determinar a prevalência de lesões placentárias consistentes com compromisso da perfusão, tendo por base a idade gestacional de aparecimento da PE. Comparativamente a grávidas sem patologia, na PE são detetados histologicamente mais casos de vascularização placentária comprometida (43,3% *versus* 15,9%), com especial destaque para os casos de PE precoce. Estes resultados mantêm a sua consistência independentemente do *cut-off* utilizado para distinguir a PE precoce da tardia (32 a 37 semanas), pelo que se conclui que a prevalência destas lesões diminui de forma contínua e gradual à medida que aumenta a idade gestacional de instalação da patologia. Deste modo, não é possível identificar um *cut-off* que discrimine por completo a PE precoce e tardia pois, ainda que menos evidentes, as lesões vasculares não deixam de existir nos casos de aparecimento tardio.<sup>66</sup>

### **Hemodinâmica placentária**

Tobinaga *et al.*<sup>67</sup> e Yu *et al.*<sup>68</sup> tentaram estabelecer uma correlação entre a resistência da artéria uterina, a libertação de fatores angiogénicos e a duração da gravidez. Nos casos de PE precoce, comparativamente aos tardios, observaram um maior índice de resistência das artérias uterinas que se encontrava acima do percentil 95 em 77,2% dos casos. Esse aumento de resistência estava correlacionado com o aumento dos fatores antiangiogénicos sFLT-1 ( $r=0,56$ ,  $p<0,0001$ ) e sEng ( $r=0,52$ ,  $p<0,0001$ ), com uma menor duração da gravidez ( $r= -0,51$ ,  $p<0,0001$ ) e,

consequentemente, maior prevalência de partos pré-termo iatrogénicos. Por sua vez, na PE tardia, só em 32% dos casos é que o índice de resistência se encontrou acima do percentil 95. Nos casos em que não se verificaram anormalidades no estudo Doppler não se verificaram diferenças significativas nestes mediadores entre os casos precoces e tardios. Desta forma, foi possível concluir que as anormalidades vasculares, mais frequentes e graves na PE precoce, estão correlacionadas com a libertação de fatores antiangiogénicos e menor duração da gravidez.<sup>67,68</sup>

Huppertz *et al.* propõem que as alterações na PE podem ser tão precoces quanto na diferenciação da mórula para trofoblasto ou na diferenciaccção do trofoblasto em citotrofoblasto e sinciotrofoblasto. Estas alterações nos estádios iniciais conduzem a uma disfunção placentária grave, que causa PE associada a RCIU.<sup>69</sup> Esta associação foi testada por Vatten *et al.*<sup>70</sup> e Verlohren *et al.*<sup>71</sup>, que compararam o peso ao nascimento em casos de PE precoce e tardia. Verificaram que a PE precoce está relacionada com baixo peso ao nascimento, associado a um índice de resistência das artérias uterinas superior ao percentil 90. Por outro lado, a PE tardia apresenta uma distribuição bimodal, tanto com recém nascidos pequenos para a idade gestacional como grandes para a idade gestacional, estes últimos não relacionados com um índice de resistência inferior ao percentil 10.<sup>70</sup> Deste modo, verificou-se que nos casos de PE precoce existem lesões vasculares placentárias que resultam num compromisso da vascularização e, consequentemente, do crescimento fetal. Por outro lado, na PE tardia, apenas uma pequena percentagem dos casos apresentou lesões vasculares, o que contribui para a hipótese de existirem duas etiologias diferentes para a PE tardia, apenas uma delas partilhada com a PE precoce. Ainda não está esclarecido o mecanismo fisiopatológico associado à PE tardia com fetos grandes para a idade gestacional, mas é possível que exista uma incapacidade do coração materno em satisfazer as necessidades metabólicas de uma unidade feto-placentária aumentada, levando a hipóxia.

Deste modo, a hipóxia seria uma condição comum aos dois tipos de PE mas com diferentes fatores desencadeadores.<sup>71</sup> O estudo populacional de Lisonkova *et al.*<sup>11</sup> suporta esta hipótese, uma vez que observaram uma significativa correlação positiva entre a PE tardia e a diabetes mellitus, patologia associada a fetos macrossômicos.<sup>11</sup> Deste modo, as necessidades nutricionais fetais ultrapassam a capacidade placentária de sustentar o crescimento fetal, levando à produção fetal de fatores antiangiogénicos que contribuem para a hipóxia. Grávidas com mau controlo glicémico apresentam duas vezes mais risco de desenvolver PE (18% *versus* 9,8%) e, em 80% dos casos, não se observam lesões placentares.<sup>72</sup> Também a apneia do sono é mais frequente nos casos de PE tardia (88,9% *versus* 5,5%) pois a hipóxia intermitente noturna leva a uma resposta inflamatória sistémica e disfunção endotelial.<sup>73</sup>

Mitsui *et al.*<sup>74</sup> compararam o desenvolvimento neonatal nos recém nascidos de grávidas com PE precoce ou tardia. Nos casos de PE precoce verificou-se uma maior percentagem de ganho de peso durante o período neonatal (36,7% *versus* 35,4%), em comparação com a PE tardia, o que leva a crer que esta compensação se deve ao desaparecimento do fator comprometedor do crescimento, após o parto. No entanto, estes valores não são estatisticamente significativos e o período neonatal é demasiado curto para inferir sobre o crescimento do recém-nascido. Serão necessários mais estudos para avaliar o crescimento durante a infância.<sup>74</sup>

A perfusão placentarária pode ser avaliada *in vivo* através de ressonância magnética. Um dos principais parâmetros para esta avaliação é a fração de perfusão, que corresponde a uma estimativa da fração de volume placentário que é perfundido. Sohlberg *et al.*<sup>75</sup> compararam a fração de perfusão em grávidas com PE precoce ou tardia com grávidas sem patologia e a mesma idade gestacional. Nos casos de PE precoce verificou-se uma fração de perfusão de 19%, inferior às grávidas sem patologia, que apresentavam uma fração de perfusão de 36%. Na PE tardia, a

fração de perfusão foi de 35%, superior à perfusão das grávidas sem patologia (28%). Desta forma, existe hipoperfusão placentária na PE precoce e hiperperfusão na PE tardia, o que poderá estar relacionado com o estado hemodinâmico materno.<sup>75</sup>

### **Hemodinâmica materna**

Valensise *et al.*<sup>76</sup> colocaram a hipótese de a PE precoce e tardia se desenvolverem a partir de estados hemodinâmicos distintos. Para testar esta hipótese, avaliaram a resistência vascular e a morfologia do ventrículo esquerdo às 24 semanas, num grupo de grávidas normotensas mas com alto risco de desenvolver PE, por apresentarem incisura protodiastólica bilateral na avaliação Doppler da artéria uterina às 20-22 semanas. Das 1345 grávidas avaliadas, 75 vieram a desenvolver PE precoce e 32 desenvolveram PE tardia. Nos casos de PE precoce observou-se IMC normal, permanência da incisura da artéria uterina, morfologia concêntrica do ventrículo esquerdo e um estado hipodinâmico com baixo débito cardíaco e alta resistência vascular. Pelo contrário, a PE tardia mostrou estar correlacionada com o IMC materno, desaparecimento da incisura e um estado hiperdinâmico de alto débito cardíaco e resistência vascular normal ou diminuída. Deste modo, concluíram que a PE precoce resulta de uma falha na remodelação vascular e que a tardia está relacionada com fatores constitucionais maternos. No entanto, a persistência de incisura da artéria uterina na PE tardia é superior aos controles (15,6% *versus* 6%) pelo que, num grupo restrito de casos, existe envolvimento placentário.<sup>76</sup> Tendo em conta o facto que as grávidas foram pré-seleccionadas, poderá questionar-se o grau de fiabilidade destes resultados, que poderão não traduzir a realidade para as grávidas saudáveis. Esta pré-selecção também poderá ser a justificação para a prevalência de PE precoce ser superior à tardia, o que não se verifica na população geral de grávidas. Por outro lado, o maior IMC observado nos casos tardios de PE também poderá, por si só, justificar os resultados apresentados.<sup>12,76</sup>

Em resposta às alterações na unidade feto-placentária existe uma remodelação vascular materna, que poderá traduzir diferentes mecanismos fisiopatológicos da PE. Stergiotou *et al.*<sup>77</sup> avaliaram e compararam a estrutura e função vasculares em casos precoces e tardios da doença, aquando do diagnóstico. Nos casos precoces observou-se um maior *stress* sobre a parede arterial, maior diâmetro e rigidez arterial, traduzida por menor distensibilidade carotídea. O aumento do diâmetro arterial poderá ser uma resposta adaptativa ao *stress* sobre a parede arterial que, por sua vez, tanto pode resultar diretamente da hipertensão arterial como da disfunção endotelial, que diminui a elasticidade dos vasos. Por sua vez, nos casos tardios não se observou aumento do diâmetro e rigidez arterial, mas um significativo aumento da espessura da parede da artéria carótida e uma menor distensibilidade venosa. Estas alterações, ausentes nos casos precoces, poderão ser o resultado de um dano vascular prévio, devido a predisposição materna. O menor grau de rigidez e de dilatação arterial reflete uma menor disfunção arterial, o que poderá justificar o menor risco cardiovascular futuro. Assim, a PE precoce resulta de um insulto agudo, com necessidade de significativa adaptação vascular, enquanto que a PE tardia resulta de uma situação de suscetibilidade materna, com melhor adaptação e, conseqüentemente, clínica mais moderada e menor risco cardiovascular futuro.<sup>77</sup> Este risco cardiovascular futuro, superior nos casos precoces de PE, resulta da combinação entre a disfunção endotelial e a rigidez arterial. Para a sua melhor compreensão, Orabona *et al.*<sup>78</sup> avaliaram as propriedades elásticas da aorta ascendente, após gravidezes complicadas com PE precoce e tardia. Nos casos de PE precoce, as propriedades elásticas da aorta ascendente, avaliadas através da complacência, distensibilidade, índice de rigidez e elasticidade, estão significativamente comprometidas. Deste modo, os autores sugeriram que na PE precoce se mantém um estado inflamatório persistente, com deterioração da microcirculação e limitação da capacidade elástica da aorta.<sup>78</sup> De igual forma, os fatores

genéticos que aumentam o risco de doença cardiovascular deverão estar implicados na PE e a genética terá, deste modo, um maior peso na fisiopatologia da PE precoce.<sup>79</sup> A irreversibilidade da disfunção endotelial, conjugada com a rigidez arterial e o risco genético promovem menor fluxo coronário e remodelação do ventrículo esquerdo, com aumento da morbidade e mortalidade cardiovasculares.<sup>59,78</sup>

## Discussão

Mais do que uma classificação, a PE precoce e tardia traduzem duas entidades distintas que resultam de diferentes vias fisiopatológicas.

De um modo geral, esta natureza heterogênea da doença resulta do culminar de diferentes graus de contribuição materna e feto-placentária. Deste modo, existindo grande contribuição feto-placentária, o desenvolvimento da PE requer pouca contribuição materna, o que ocorre na PE precoce. Por outro lado, existindo grande suscetibilidade materna, a PE desenvolve-se mesmo com ligeiro compromisso feto-placentário, traduzindo-se em PE tardia.<sup>8</sup> (Fig. 1)

A PE precoce resulta de um preponderante compromisso da unidade feto-placentária que se traduz desde o início da gravidez, aquando da diferenciação e proliferação das células do trofoblasto. Desta forma, a deficiente invasão trofoblástica impede a remodelação das artérias espiraladas e compromete a angiogénese. A base destas alterações ainda não está bem esclarecida mas sabe-se estar na dependência de uma desregulação imunológica, ainda que esta não seja suficiente para explicar todas as características da PE precoce, tal como a maior recorrência da PE precoce face à tardia. Também a suscetibilidade genética poderá estar envolvida. O compromisso da angiogénese traduz-se num aumento dos fatores antiangiogénicos (sFLT-1 e sEng) e diminuição dos fatores pró-angiogénicos (VEGF, PlGF), pelo que os seus doseamentos marcadamente alterados na PE precoce indicam um componente placentário predominante.<sup>38</sup> Porém, estas alterações são semelhantes às que ocorrem na RCIU, pelo que se conclui que as alterações placentárias não são suficientes para o desenvolvimento da PE, sendo necessária uma interação com fatores constitucionais maternos genéticos, comportamentais e ambientais. Também o estudo Doppler das artérias uterinas e o exame histológico placentário são

incapazes de distinguir PE precoce de RCIU, traduzindo maior resistência arterial e evidência de má perfusão em ambas as patologias.<sup>8</sup>

Conseqüentemente à angiogênese comprometida, o fluxo sanguíneo é interrompido e surgem eventos de hipóxia/reoxigenação que são um importante estímulo para o *stress* oxidativo e do RE. Assim, há acumulação de espécies reativas de oxigênio, diminuição do óxido nítrico e morte celular. Em consequência, há maior liberação de fatores placentários, como os STBM, que interagem com o endotélio materno levando a disfunção endotelial. Estas partículas encontram-se aumentadas na PE precoce mas não na RCIU, pelo que poderão justificar a ausência de síndrome materna na RCIU e ajudar na distinção entre estas patologias. É possível que a produção de alguns destes fatores seja uma resposta ao aporte nutricional insuficiente do feto, levando a alterações no metabolismo materno para que aumente a disponibilidade de nutrientes.<sup>8</sup>

No que concerne à PE tardia, acredita-se que esta apresenta duas etiologias distintas: uma delas, semelhante à da PE precoce, está relacionada com má perfusão placentária e conseqüentemente fetos pequenos para a idade gestacional. A segunda via etiológica ainda não está bem esclarecida mas sabe-se ser independente de lesões placentárias, levando a que os biomarcadores e o Doppler das artérias uterinas tenham menor valor preditivo quando se trata de diagnosticar PE tardia.<sup>71</sup> Foram propostas três hipóteses para explicar o aparecimento de PE tardia na ausência de compromisso placentário:

1. incapacidade de satisfazer as necessidades fetais por existir uma unidade feto-placentária aumentada, tal como acontece na diabetes ou numa gravidez gemelar, o que leva a hipóxia feto-placentária com liberação de mediadores que desencadeiam a resposta inflamatória sistémica e disfunção endotelial;



2. alterações metabólicas maternas como resistência à insulina e excesso de peso, que aumentem a sua suscetibilidade à doença;
3. hipersensibilidade materna à resposta inflamatória fisiológica da gravidez, o que justifica a inexistência de ativação das vias de *stress* placentário nesta patologia.<sup>47</sup>

Estas diferentes vias conjugam-se e potenciam-se aumentando a predisposição para o desenvolvimento da doença, mesmo na ausência de alterações placentárias. Nestes casos, o desenvolvimento fetal está menos comprometido e há menos alterações vasculares maternas, o que justifica o melhor prognóstico. No entanto, a PE tardia é uma patologia muito heterogénea, o que poderá dificultar a identificação da melhor abordagem clínica (Fig. 2).

Deste modo, o reconhecimento de alterações vasculares através do doseamento de biomarcadores ou estudo Doppler permitirá identificar grávidas com alto risco de desenvolvimento de PE precoce, sendo que algoritmos que conjuguem diferentes marcadores são os que obtêm os melhores valores preditivos. A identificação de grávidas com alto risco de desenvolvimento de PE tardia é mais desafiante dada a dependência de factores de suscetibilidade materna, difíceis de quantificar. Por outro lado, a coexistência de diabetes gestacional ou outra patologia metabólica poderá sugerir um maior risco de desenvolvimento desta entidade. Desta forma, esta distinção permitirá:

- iniciar atempadamente estratégias preventivas;
- planear uma monitorização adequada;
- controlar a clínica;
- identificar precocemente possíveis complicações.

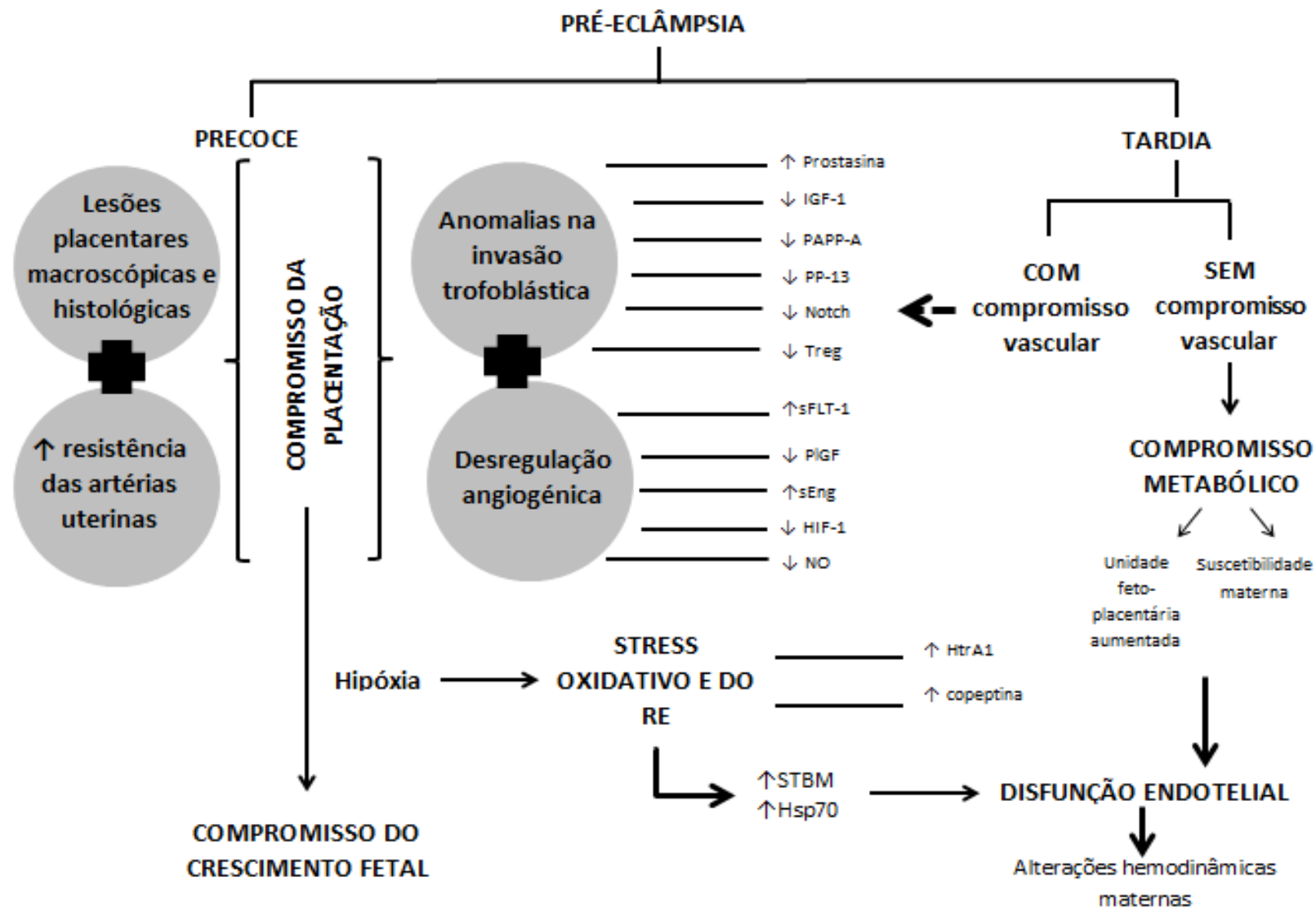


Figura 1 - Contribuição feto-placentária e materna para o desenvolvimento da PE. A PE precoce resulta de um compromisso vascular da unidade feto-placentária enquanto que o compromisso metabólico materno tem um papel preponderante no desenvolvimento da PE tardia.

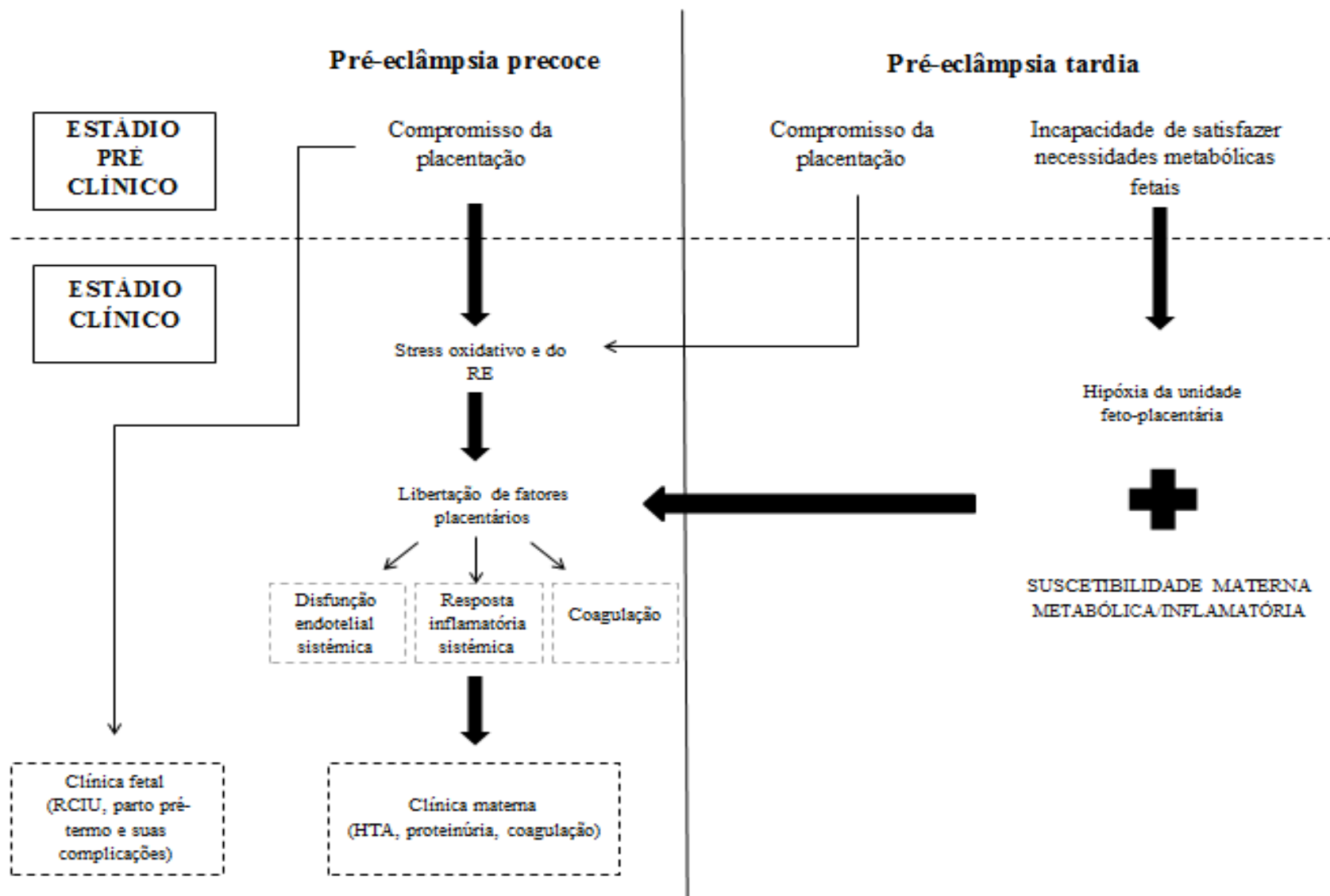


Figura 2 - **Processos implicados no desenvolvimento da PE precoce e tardia.** A placenta como intermediário entre o estágio pré-clínico e clínico, quer por alterações vasculares na PE precoce como por alterações metabólicas na PE tardia.

## Referências bibliográficas

1. Machado S, Neves M, Freitas L, Campos, M. Diagnosis , pathophysiology and management of pre-eclampsia : a review. *Rev. Port. Nefrol. e Hipertens.* 27, 153–161 (2013).
2. Hypertension in pregnancy. *Am. Coll. Obstet. Gynecol.* (2013).
3. Duhig KE, Shennan AH. Recent advances in the diagnosis and management of pre-eclampsia. *F1000 Prime reports* 7, (2015).
4. Póvoa M, Costa F, Rodrigues T, Patrício B, Cardoso, F. Prevalence of hypertension during pregnancy in Portugal. *Hypertens. Pregnancy.* 27, 279–84 (2008).
5. Axe, M. Urine Proteomics Identifies Preeclampsia Subphenotypes. Honors Thesis Projects (2015).
6. Shah DA, Khalil RA. Bioactive factors in uteroplacental and systemic circulation link placental ischemia to generalized vascular dysfunction in hypertensive pregnancy and preeclampsia. *Biochem. Pharmacol.* 95, 211–26 (2015).
7. Andraweera PH, Dekker GA, Roberts CT. The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. *Hum. Reprod. Update.* 18, 436–457 (2012).
8. Roberts JM, Hubel CA. The Two Stage Model of Preeclampsia: Variations on the Theme. *Placenta* 30, 32–37 (2009).

9. Von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy.* 22, 143–148 (2003).
10. Reis ZSN, Lage ME, Teixeira PG, Porto LB, Guedes LR, et al. Pré-eclâmpsia precoce e tardia: uma classificação mais adequada para o prognóstico materno e perinatal? *Rev. Bras. Ginecol. e Obs.* 32, 584–590 (2010).
11. Lisonkova S, Joseph KS. Incidence of preeclampsia: Risk factors and outcomes associated with early- versus late-onset disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 209, 544 (2013).
12. Sibai BM. Maternal and Uteroplacental Hemodynamics for the Classification and Prediction of Preeclampsia. *Hypertension* 52, 805–806 (2008).
13. Yang Y, Zhang J, Gong Y, Liu X, Bai Y, et al. Increased expression of prostaticin contributes to early-onset severe preeclampsia through inhibiting trophoblast invasion. *J. Perinatol.* 35, 16–22 (2015).
14. Vatten LJ, Ødegård RA, Nilsen ST, Salvesen KA, Austgulen R. Relationship of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins in umbilical cord plasma to preeclampsia and infant birth weight. *Obstet. Gynecol.* 99, 85–90 (2002).
15. Huppertz B, Meiri H, Gizurarson S, Osol G, Sammar M. Placental protein 13 (PP13): a new biological target shifting individualized risk assessment to personalized drug design combating pre-eclampsia. *Hum. Reprod. Update* 19, 391–405 (2013).

16. Nicolaides KH, Bindra R, Turan OM, et al. A novel approach to first-trimester screening for early pre-eclampsia combining serum PP-13 and Doppler ultrasound. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 27, 13–7 (2006).
17. Spencer, K., Cowans, N. J. & Nicolaides, K. H. Low levels of maternal serum PAPP-A in the first trimester and the risk of pre-eclampsia. *Prenat. Diagn.* 28, 7–10 (2008).
18. Zhao WX, Huang TT, Jiang M, Feng R, Lin JH. Expression of Notch Family Proteins in Placentas From Patients With Early-Onset Severe Preeclampsia. *Reprod. Sci.* 21, 716–723 (2014).
19. Fragkiadaki P, Soultzis N, Sifakis S, Koutroulakis D, et al. Downregulation of Notch Signaling Pathway in Late Preterm and Term Placentas from Pregnancies Complicated by Preeclampsia. *PLoS One* 10, e0126163 (2015).
20. Shimanuki Y, Mitomi H, Fukumura Y. Alteration of Delta-like ligand 1 and Notch 1 receptor in various placental disorders with special reference to early onset preeclampsia. *Hum. Pathol.* 46, 1129–1137 (2015).
21. Van Rijn BB, Hoeks LB, Bots ML, Franx A, Bruinse HW. Outcomes of subsequent pregnancy after first pregnancy with early-onset preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 195, 723–728 (2006).
22. Zhang J, Troendle JF, Levine RJ. Risks of hypertensive disorders in the second pregnancy. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 15, 226–231 (2001).

23. Hernández-Díaz S, Toh S, Cnattingius S. Risk of pre-eclampsia in first and subsequent pregnancies: prospective cohort study. *BMJ* 338, b2255 (2009).
24. Quinn KH, Lacoursiere DY, Cui L, Bui J, Parast M. The unique pathophysiology of early-onset severe preeclampsia: Role of decidual T regulatory cells. *J. Reprod. Immunol.* 91, 76–82 (2011).
25. Khodzhaeva ZS, Kogan EA, Shmakov RG, Klimenchenko NI, et al. Clinical and pathogenetic features of early and late onset preeclampsia. *J. Matern. Neonatal Med.* 7058, (2015).
26. Rolfo A, Many A, Racano A, Tal R, Tagliaferro A, et al. Abnormalities in Oxygen Sensing Define Early and Late Onset Preeclampsia as Distinct Pathologies. *PLoS One* 5, e13288 (2010).
27. Chaiworapongsa T, Romero R, J Espinoza, et al. Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190, 1541–50 (2004).
28. Levine RJ, Maynard S, Quian C, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 350, 672–683 (2004).
29. Wikström AK, Larsson A, Eriksson P, Ulf J, et al. Placental Growth Factor and Soluble FMS. *109*, 1368–1374 (2007).

30. Lapaire O, Shennan A, Stepan H. The preeclampsia biomarkers soluble fms-like tyrosine kinase-1 and placental growth factor: Current knowledge, clinical implications and future application. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 151, 122–129 (2010).
31. Parra-Cordero M, Rodrigo R, Barja P, Bosco C, et al. Prediction of early and late preeclampsia from maternal characteristics, uterine artery Doppler and markers of vasculogenesis during first trimester of pregnancy. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 41, 538–44 (2013).
32. Verlohren S, Galindo A, Schlembach D, Zeisler H, et al. An automated method for the determination of the sFlt-1/PIGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 202, 161.e1–161.e11 (2010).
33. Crispi F, Llurba E, Dominguez C, et al. Predictive value of angiogenic factors and uterine artery Doppler for early- versus late-onset pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* (2008).
34. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat. Med.* 12, 642–649 (2006).
35. Akolekar R, Syngelaki A, Sarquis R, Zvanca M, Nicolaides H. Prenatal diagnosis of the early, intermediate and late pre-eclampsia from maternal factors, biophysical and biochemical markers at 11-13 weeks. *Prenat. Diagn.* 31, 66–74 (2011).
36. Jenkin G, Ward J, Loose J, Kolsky M, et al. Physiological and regulatory roles of activin A in late pregnancy. *Mol. Cell. Endocrinol.* 180, 131–138 (2001).



37. Ferreira LC, Gomes C, Araujo A, Bezerra P, et al. Association between ACVR2A and early-onset preeclampsia: Replication study in a Northeastern Brazilian population. *Placenta* 36, 186–190 (2015).
38. Llurba E, Crispi F, Verlohren S. Update on the Pathophysiological Implications and Clinical Role of Angiogenic Factors in Pregnancy. *Fetal Diagn. Ther.* 37, 81–92 (2015).
39. Soto E, Romero R, Kusanovic J, Ogge G, et al. Late onset preeclampsia is associated with an imbalance of angiogenic and anti-angiogenic factors in patients with and without placental lesions consistent with maternal underperfusion. *25*, 498–507 (2013).
40. Masuyama H, Segawa T, Sumida Y, Masumoto A, et al. Different profiles of circulating angiogenic factors and adipocytokines between early- and late-onset pre-eclampsia. *BJOG.* 117, 314–320 (2010).
41. Matsubara K, Higaki T, Matsubara Y, Nawa A. Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 4600–4614 (2015).
42. Escudero C, Bertoglia P, Hernandez M, et al. Impaired A2A adenosine receptor/nitric oxide/VEGF signaling pathway in fetal endothelium during late- and early-onset preeclampsia. *Purinergic Signal.* 9, 215–226 (2013).
43. Salsoso R, Gutierrez E, Saez T, et al. Insulin restores l-arginine transport requiring adenosine receptors activation in umbilical vein endothelium from late-onset preeclampsia. *Placenta.* 36. (2015).

44. Alpoim PN, Braga K, Barros M, et al. Nitric Oxide Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase gene in early and late severe preeclampsia. *Nitric Oxide* 42, 19–23 (2014).
45. Salimi S, Saravani M. The early-onset preeclampsia is associated with MTHFR and FVL polymorphisms. *Arch. Gynecol. Obstet.* 1303–1312 (2015).
46. Burton GJ, Yung HW. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of early-onset pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 1, 72–78 (2011).
47. Yung HW, Atkinson D, Smith T, Olovsson M, et al. Differential activation of placental unfolded protein response pathways implies heterogeneity in causation of early- and late-onset pre-eclampsia. *J. Pathol.* 262–276 (2014).
48. Fu J, Zhao L, Wang L, Zhu X. Expression of markers of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the placenta of women with early and late onset severe pre-eclampsia. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 54, 19–23 (2015).
49. Teoh SSY, Zhao M, Wang Y, Chen Q, Nie G. Serum HtrA1 is differentially regulated between early-onset and late-onset preeclampsia. *Placenta* 36, 990–995 (2015).
50. Peraçoli JC, Castro C, Romao M, Well I, et al. High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. 100, 129–134 (2013).
51. D’Anna, R, Baviera G, Corrado F, Giordano D, et al. Adiponectin and insulin resistance in early- and late-onset pre-eclampsia. *BJOG.* 113, 1264–1269 (2006).

52. Masuyama H, Nobumoto E, Inoue S, Hiramatsu Y. Potential interaction of brain natriuretic peptide with hyperadiponectinemia in preeclampsia. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E687–93 (2012).
53. Zulfikaroglu E, Islimye M, Tonguc E, Payasli A, et al. Circulating levels of copeptin, a novel biomarker in pre-eclampsia. *J. Obstet. Gynaecol.* 37, 1198–202 (2011).
54. Tuten A, Oncul M, Kucur M, Imamoglu M, et al. Maternal serum copeptin concentrations in early- and late-onset pre-eclampsia. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 54, 350–354 (2015).
55. Chen Y, Huang Y, Jiang R, Teng Y. Syncytiotrophoblast-derived microparticle shedding in early-onset and late-onset severe pre-eclampsia. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 119, 234–238 (2012).
56. Goswamia D, Tannetta D, Magee L, Fushisawa A, et al. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta* 27, 56–61 (2006).
57. Redman CWG, Tannetta D, Dragovic R, Gardiner C, et al. Review: Does size matter? Placental debris and the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta* 33, S48–S54 (2012).
58. Tannetta D, Sargent I. Placental Disease and the Maternal Syndrome of Preeclampsia: Missing Links? *Curr Hypertens Rep* 15, 590–599 (2013).
59. Mori T, Watanabe K, Iwasaki A, Kimura C, Wakatsuki A. Vascular reactivity and carotid artery intima media thickness (IMT) in women with early and late-onset preeclampsia and chronic hypertension. *Pregnancy Hypertens.* 5, 147 (2015).

60. Vogel RA, Measurement of endothelial function by brachial artery flow-mediated vasodilation. *Am. J. Cardiol.* 88, 31E–34E (2001).
61. Brandão AHF, Evangelista AA, Martins RMF, Leite HV, Cabral ACV. Prediction of early and late preeclampsia by flow-mediated dilation of the brachial artery. 47, 206–209 (2014).
62. Egbor M, Ansari T, Morris N, Green CJ, Sibbons PD. Morphometric placental villous and vascular abnormalities in early- and late-onset pre-eclampsia with and without fetal growth restriction. *BJOG.*113, 580–589 (2006).
63. Van der Merwe JL, Hall DR, Wright C, Schubert P, Grové D. Are early and late preeclampsia distinct subclasses of the disease-what does the placenta reveal? *Hypertens. Pregnancy* 29, 457–467 (2010).
64. Mifsud W, Sebire NJ. Placental Pathology in Early-Onset and Late-Onset Fetal Growth Restriction. *Fetal Diagn. Ther.* 36, 117–128 (2014).
65. Mukherjee R. Morphometric evaluation of preeclamptic placenta using light microscopic images. *Biomed Res. Int.* 2014, (2014).
66. Ogge G, Chaiworapongsa T, Romero R, Hussein Y, Kusanovic J, et al. Placental lesions associated with maternal underperfusion are more frequent in early-onset than in late-onset preeclampsia. *J Perinat Med* 39, 641–652 (2011).

67. Tobinaga CM, Torloni M, Silva B, et al. Angiogenic factors and uterine Doppler velocimetry in early- and late-onset preeclampsia. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 93, 469–476 (2014).
68. Yu, CKH, Khouri O, Onwudiwe N, Spiliopoulos Y, Nicolaides KH. Prediction of pre-eclampsia by uterine artery Doppler imaging: Relationship to gestational age at delivery and small-for-gestational age. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 31, 310–313 (2008).
69. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: Challenging the current hypothesis. *Hypertension* 970–975 (2008).
70. Vatten LJ, Skjærven R. Is pre-eclampsia more than one disease? *BJOG.* 111, 298–302 (2004).
71. Verlohren S, Melchiorre K, Khalil A, Thilaganathan B. Uterine artery Doppler, birth weight and timing of onset of pre-eclampsia: Providing insights into the dual etiology of late-onset pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 293–298 (2014).
72. Espinoza J. Uteroplacental ischemia in early- and late-onset pre-eclampsia: a role for the fetus? *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 40, 373–382 (2012).
73. Vodneva DN, Romanova VV, Dubova EA, Pavlov KA, Shmakov RG. The clinical and morphological features of early- and late-onset preeclampsia. *Akusherstvo i ginekologija* (2014).

74. Mitsui T, Masuyama H, Eto E, Nobumoto E, Hayata K. Different Fetal and Neonatal Growth between Early- and Late-Onset Preeclampsia. *Open J. Obstet. Gynecol.* 516–521 (2015).
75. Sohlberg S, Lutvica A, Lindgren P, Nieto F, et al. Placental perfusion in normal pregnancy and early and late preeclampsia: A magnetic resonance imaging study. *Placenta* 35, 202–206 (2014).
76. Valensise H, Vasapollo B, Gagliardi G, Novelli, GP. Early and Late preeclampsia: Two different maternal hemodynamic states in the latent phase of the disease. *Hypertension.* 52, 873–880 (2008).
77. Stergiotou I, Crispi F, Valenzuela-Alcaraz B, Bijmens B, Gratacos E. Patterns of maternal vascular remodeling and responsiveness in early-versus late-onset preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 209, 558.e1–558.e14 (2013).
78. Orabona R, Sciatti E, Vizzardì E, et al. Elastic properties of ascending aorta in patients with a previous pregnancy complicated by early or late preeclampsia. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* (2015).
79. Irgens HU, Reisaeter L, Irgens LM, Lie RT. Long term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia: population based cohort study. *BMJ.* 323, 1213–1217 (2001).