

MESTRADO INTEGRADO

MEDICINA

DNA fetal livre no Desenvolvimento de Pré-eclâmpsia

Margarida Figueiredo

M

2019



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

DNA fetal livre no Desenvolvimento de Pré-eclâmpsia

Margarida Alexandra Teixeira de Figueiredo

Endereço de correio eletrónico: margaridafigas95@gmail.com

Orientadora

Doutora Maria Luísa Santos Ferreira Vieira

Docente Convidada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto

Assistente Hospitalar Graduada de Ginecologia e Obstetrícia no Centro Materno Infantil do Norte - Centro Hospitalar Universitário do Porto

Coorientador

Professor Doutor Luís Guedes-Martins

Professor Auxiliar Convidado do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Assistente Hospitalar de Ginecologia e Obstetrícia no Centro Materno Infantil do Norte - Centro Hospitalar Universitário do Porto

Junho 2019

DNA fetal livre no Desenvolvimento de Pré-eclâmpsia

Dissertação de Mestrado Integrado

Porto, 5 de Junho de 2019

Aluno:

Margarida Figueiredo

Orientadora:

Luís Pereira

Coorientador:

Guilherme

Dedicatória

À minha mãe, pelo apoio incansável

À minha avó, por todo o amor

Aos meus irmãos, para que alcancem o mesmo ou mais

Agradecimentos

Um agradecimento especial à Dr^a Luísa Vieira por toda a ajuda, orientação, interesse e disponibilidade constante.

Ao ICBAS e à Universidade do Porto, pelo caminho que me permitiram percorrer.

Resumo

Introdução: A Pré-eclâmpsia é uma das principais causas de morbidade e mortalidade materno-fetal em todo o mundo. Por esse motivo, é necessária a criação e implementação de testes economicamente acessíveis e capazes de serem amplamente aplicados que permitam o diagnóstico precoce da doença, antes de se manifestem os seus sintomas. O DNA fetal livre no sangue materno é um biomarcador, com várias aplicações na área da Obstetrícia, com alta sensibilidade e especificidade para o rastreio das Trissomias 13, 18 e 21 e aneuploidias dos cromossomas sexuais, promissor no rastreio da pré-eclâmpsia.

Objetivos: Estudos anteriores demonstraram um aumento da quantidade de DNA fetal livre nas grávidas com pré-eclâmpsia. O objetivo é rever a literatura atual acerca da possibilidade de este biomarcador se encontrar aumentado antes do desenvolvimento dos sintomas para que possa ser usado no rastreio da doença. Seria benéfico se um nível específico de DNA fetal livre definisse o risco de desenvolver pré-eclâmpsia para que se implementem medidas preventivas e estratégias específicas que diminuam a mortalidade e morbidade materno-fetal.

Metodologia: Efetuou-se uma pesquisa da literatura disponível na base de dados bibliográfica PubMed para identificar estudos relevantes que incluíssem os níveis de DNA fetal livre em mulheres grávidas com pré-eclâmpsia e em mulheres grávidas antes de desenvolverem os sintomas clínicos de pré-eclâmpsia.

Resultados e Conclusões: Os níveis de DNA fetal livre no sangue materno são um marcador promissor de rastreio de pré-eclâmpsia, especialmente se se tratar de pré-eclâmpsia severa ou de início precoce.

Palavras-Chave: ‘preeclampsia and cell-free DNA’, ‘preeclampsia and fetal DNA’, ‘preeclampsia and non-invasive prenatal diagnosis’.

Abstract

Introduction: Preeclampsia is one of the leading causes of maternal and fetal/neonatal mortality and morbidity worldwide. Therefore, widely applicable and affordable tests are needed to make an early diagnosis before the occurrence of the clinical symptoms. Circulating cell free nucleic acids in maternal plasma are novel biomarkers with different clinical applications in the Obstetric field, with high sensibility and specificity in screening Trisomy 13, 18 and 21 and in aneuploidies of sex chromosomes with promising abilities in the screening of preeclampsia.

Objectives: Previous studies have demonstrated an increase in the quantity of cell free fetal DNA in pregnant women with preeclampsia. The objective is to review the literature on the possibility of using cell free fetal DNA levels as a predictor of preeclampsia since this levels could be increased before the clinical onset of the symptoms in order to implement preventative trials and strategies to decrease maternal and fetal morbidity.

Methods: A comprehensive literature search on the PubMed database was conducted to identify relevant studies that evaluated cell free fetal DNA levels in pregnant women with PE and in pregnant women before the clinical onset of PE.

Results and Conclusions: Cell free fetal DNA levels are a promising marker of preeclampsia, especially of early-onset or severe preeclampsia.

Key Words: 'preeclampsia AND cell-free DNA', 'preeclampsia AND fetal DNA', 'preeclampsia AND non-invasive prenatal diagnosis'.

Lista de Abreviaturas/Abbreviation Index

PE – Pré-eclâmpsia

cfDNA – DNA livre

cffDNA – DNA fetal livre

Flt-1 – Recetor 1 do Fator de Crescimento Endotelial Vascular

PlGF – Fator de Crescimento Placentar

NETs – Redes Extracelulares de Neutrófilos

Índice

Introdução	1
Métodos.....	3
Patofisiologia da Pré-eclâmpsia.....	4
Origem do DNA fetal livre.....	5
Relação entre o DNA fetal livre e a Pré-eclâmpsia.....	6
Aumento do DNA fetal livre na Pré-eclâmpsia.....	6
DNA fetal livre na Pré-eclâmpsia Precoce/Severa vs. DNA fetal livre na Pré-eclâmpsia Tardia/Ligeira.....	8
DNA fetal livre sem relação com a Pré-eclâmpsia.....	10
Conclusão.....	11
Anexos	12
Tabela de Resultados.....	15
Bibliografia.....	19

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Relação de DNA fetal e Pré-eclâmpsia.....	15
--	----

Lista de Figuras

Figura 1 - Alterações Placentares e Pré-eclâmpsia	1
Figura 2 - Mecanismos de Pré-eclâmpsia	13
Figura 3 - Liberação de DNA fetal.....	14

Introdução

A pré-eclâmpsia (PE) é uma complicação grave da gravidez que envolve vários sistemas incluindo os rins, fígado, cérebro, pulmões e sistema circulatório.¹ Apesar da sua etiologia não estar esclarecida, evidências sugerem que a disfunção que se estabelece ocorre a nível dos fatores angiogénicos.³ A lesão endotelial, será portanto, o denominador comum dos danos tecidulares multissistémicos, que impede o normal funcionamento dos vasos.⁴ A nível placentar, surge uma invasão trofoblástica deficiente das artérias espiraladas maternas, resultando em hipóxia da placenta com consequente necrose tecidular e libertação de citocinas inflamatórias, originando disfunção vascular endotelial.⁵

Esta patologia permanece uma das principais causas de mortalidade e morbilidade severa materno-fetal, complicando cerca de 8% das gravidezes em todo o mundo.⁶ Por esse motivo, testes que sejam capazes de diagnosticar esta patologia antes das suas manifestações clínicas são de extrema importância. Adicionalmente, a identificação de grávidas em risco de desenvolver PE permitirá uma atuação médica mais eficaz e uma melhor referência para centros especializados.⁷

Na prática clínica, o diagnóstico de PE baseia-se em critérios clínicos como o valor de pressão arterial e proteinúria, embora ambas as medidas sejam pouco previsíveis quanto aos desfechos e complicações adversas da doença.⁸ Por esse motivo, ao longo do tempo têm sido conduzidas várias investigações com o intuito de desenvolver novas técnicas de rastreio e diagnóstico de PE,⁹⁻¹¹ tendo sido vários os biomarcadores estudados na tentativa de rastreio desta patologia. Estudos recentes mostram que o rácio entre o fator de crescimento placentar (Flt-1) e o recetor 1 do fator de crescimento endotelial vascular (PlGF) é uma ferramenta útil,¹² sendo o primeiro teste de rastreio automatizado disponível e aprovado para avaliação rápida e fácil num contexto clínico.¹³ Este rácio permite excluir com algum grau de confiança o desenvolvimento de PE num intervalo de 4 semanas, em grávidas que apresentem score baixo deste rácio, o que poderá melhorar as decisões clínicas de hospitalização versus monitorização ambulatorial, diminuindo hospitalizações desnecessárias.¹³ Contudo, o diagnóstico pode ser excluído durante 4 semanas mas não durante toda a gravidez, e, portanto, medições seriadas devem ser consideradas.¹² No caso de apresentar score muito alto a grávida necessitará de vigilância apertada o resto da gravidez.¹³ Quando o score apresenta valores intermédio deverá ser repetido o teste em 1-2 semanas.¹³ Porém, não existem ainda estudos sobre o outcome da gravidez após a utilização deste rácio na prática clínica.¹² A sua sensibilidade e especificidade como teste de rastreio é maior para PE precoce do que para PE tardia¹³.

Em 1997, Lo et al detetaram a presença de frações de DNA fetal livre (cffDNA) na circulação maternal. O seu descobrimento revolucionário tornou o diagnóstico pré-natal não invasivo possível, tornando o cffDNA um biomarcador promissor com diferentes aplicabilidades clínicas na área da Obstetrícia. Até esta data, o material genético fetal era apenas obtido por amniocentese ou por biópsia das vilosidades coriônicas. As suas atuais aplicações na prática clínica são vastas e incluem a determinação do sexo e genótipo RHD fetais, a detecção de aneuploidias e patologias monogénicas.¹⁴

O cff-DNA tem origem nas vilosidades coriônicas que, estando em constante *turn-over* celular, provocam a extrusão de diverso material apoptótico, onde este se inclui, para a circulação materna. Por esse motivo, a sua libertação está fortemente relacionada com a morfogénese placentar.¹⁰

Segundo vários estudos, existe uma associação positiva entre a quantidade de cffDNA no sangue materno e a ocorrência de PE. Verificando-se um aumento deste biomarcador em grávidas com a patologia quando comparadas com grávidas saudáveis.^{7,10,11,15,16} O aumento é particularmente marcado em mulheres que apresentem PE severa.¹⁶ Estes achados parecem ser atribuídos à isquemia placentar que provoca apoptose acelerada das células trofoblásticas, tendo como consequência um aumento da libertação de cffDNA.¹⁵

Os estudos mostram que no grupo das grávidas que desenvolvem a patologia, os níveis de cffDNA já se encontravam elevados antes da manifestação dos sintomas clínicos.¹⁷ Este aumento poderá refletir o início da insuficiência placentar numa idade gestacional precoce antes da manifestação dos sintomas.¹⁰

Contudo, existe ainda forte controvérsia em relação à possibilidade do cffDNA poder ser usado como biomarcador preditivo de PE, bem como, do seu uso na prática clínica como possível método de rastreio diagnóstico pré-natal.¹⁰

Métodos

Para a realização deste artigo foi efetuada uma pesquisa de artigos na base de dados bibliográfica PubMed, utilizando os termos 'preeclampsia and cell-free DNA', 'preeclampsia and fetal DNA' e 'preeclampsia and non-invasive prenatal diagnosis'.

A pesquisa bibliográfica foi realizada entre os meses de Setembro de 2018 e Março de 2019.

Foram selecionados os artigos que comparam níveis de cffDNA no sangue materno em mulheres com PE ou em mulheres que iriam desenvolver PE em contraste com grávidas controlo normotensas. Foram também selecionados artigos que comparam os níveis de cffDNA nos casos de PE severa/precoce com os casos de PE leve/tardia.

Apenas foram analisadas publicações em inglês ou português.

Foi efetuada uma pesquisa manual recorrendo às referências bibliográficas dos artigos incluídos, sempre que necessário ou pertinente.

Patofisiologia da Pré-eclâmpsia

A patogénese da PE não está ainda totalmente esclarecida, contudo, na última década, têm existido progressos nesse sentido.⁵ Duas categorias principais são apontadas como possíveis causas da doença: causas imunológicas e causas placentares.¹⁸

Durante o parto, com a libertação da placenta, ocorre uma resolução dos sintomas clínicos da PE, sugerindo um papel central desta na patogénese da doença. Durante uma gravidez normal, a placenta sofre uma série de alterações da vascularização que permitem a circulação entre o feto e a mãe. Esta vascularização implica vasculogénese, angiogénese e *remodeling* das artérias espiraladas uterinas. O desequilíbrio entre fatores pró-angiogénicos e anti-angiogénicos na PE é apontado como o possível desencadeador da anormal vascularização placentar que ocorre na doença.¹⁸

A fisiopatologia da PE inicia-se com a formação anormal dos vasos sanguíneos nas artérias espiraladas uterinas maternas. Durante uma gravidez normal, ocorrem adaptações major no útero, incluindo o *remodeling* das artérias espiraladas uterinas, com o objetivo de diminuir a resistência dos vasos sanguíneos maternos e aumentar a perfusão uteroplacentar. Este *remodeling* é conseguido através da invasão placentar do trofoblasto, bem como da alteração do seu fenótipo para um fenótipo vascular e da obliteração da camada muscular das paredes dos vasos (Figura 1).¹⁰ O processo é controlado através de inúmeras moléculas, como substâncias vasoativas, fatores de crescimento, moléculas de adesão, proteases, entre outras, secretadas pela vasculatura da placenta.¹⁹ Interferências nestas alterações podem provocar stress oxidativo e originar um estado de relativa isquemia uteroplacentar, contribuindo para o desenvolvimento de PE. Nesta patologia o *remodeling* incompleto das artérias espiraladas contribui para a isquemia placentar que se desenvolve e subsequente libertação de fatores antiangiogénicos pela placenta isquémica que contribuem para o dano endotelial sistémico que se estabelece.⁵

Apesar da PE ser originada na placenta, o tecido principalmente afetado é o endotélio materno.²⁰ As alterações na síntese e na libertação de células endoteliais iniciam a cascata de disfunção endotelial sistémica observada na doença, assim como o desequilíbrio entre prostaglandinas vasodilatadoras e vasoconstritoras.¹⁸ Por esse motivo, há um desequilíbrio entre fatores angiogénicos e anti-angiogénicos, verificando-se um aumento destes últimos.²¹ As próprias manifestações clínicas da doença evidenciam uma disfunção endotelial generalizada, com algum grau de vasoconstrição e isquemia de órgão.¹⁸

Taylor et al apontam a disfunção endotelial como o ponto fulcral da doença, afirmando que a ativação e disfunção endotelial refletem-se na inapropriada vasoconstrição e na sua propensão para um estado hipercoagulável e para a difusão de trombos microvasculares, observados em placentas pré-eclâmpicas.²²

Na PE existe acentuada inflamação sistémica, com aumento do número de radicais livres de oxigénio, stress oxidativo, bem como, aumento do número e da ativação de leucócitos.²³ Esta resposta inflamatória exagerada também se caracteriza pela produção e libertação de Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs).²⁴ Gupta et al afirmam que estas NETs, não só são respostas do sistema imune a agressões do meio, como bactérias, mas também a micropartículas do sinciotrofoblasto, que são libertadas em grandes quantidades na PE. Estas micropartículas podem induzir a sua formação a partir de neutrófilos isolados.²⁴ Adicionalmente, há evidência de presença de grande número de NETs diretamente no espaço intervilloso, das placentas pré-eclâmpicas, poderá dificultar o fluxo sanguíneo através da interface materno-fetal, já crítica, podendo conduzir a um estado de hipóxia.²⁴

Resumindo, a PE é uma doença materna sistémica, com ativação moderada a severa do sistema inflamatório, com diferentes repercussões clínicas.²³ A Figura 2 pretende resumir as várias hipóteses fisiopatológicas da doença.²

Origem do DNA fetal livre

O mecanismo exato da origem do cffDNA no sangue materno não é ainda totalmente esclarecido. A passagem transplacentar de células hematopoiéticas fetais intactas é improvável que provoque um aumento significativo dos níveis de cffDNA no sangue materno. A evidência científica aponta, em vez disso, para uma causa placentar como fonte mais plausível,²⁵ estando intimamente ligada à sua morfogénese. Tal é demonstrado pelo facto de, após o parto, ocorrer uma rápida clearance do cffDNA no sangue materno, em contraste com as restantes células fetais que sobrevivem na circulação materna várias semanas.⁹ Adicionalmente, as alterações no cffDNA aquando de casos de mosaicismo placentar confirmam a origem deste como sendo placentar e não da unidade fetal em si mesma.²⁶

A placenta humana é um órgão dinâmico, onde ocorre constante *turnover* celular, que acontece maioritariamente nas vilosidades trofoblásticas e conduz à extrusão de material apoptótico (onde o cffDNA se inclui) para a circulação materna.²⁷ Estudos mais recentes sugerem que a maior fonte de cffDNA são as células de origem trofoblástica que são libertadas pelo sinciotrofoblasto na forma de exossomas sinciciais.¹¹ Estas células sofrem apoptose e os

ácidos nucleicos e restos celulares resultantes são aglomerados no seu interior e libertadas na circulação materna (Figura 3).³ Além dos mecanismos apoptóticos, também necrose e quebras acidentais celulares podem levar à libertação de cffDNA.¹¹ Numa gravidez normal de termo, grandes quantidades de material placentar são libertados na circulação materna (a quantidade aumenta com o avançar da idade gestacional como resultado do *remodeling* fisiológico),²⁸ sem que este processo provoque uma resposta inflamatória notória.²⁹

Contudo, a maior parte do DNA livre total (cfDNA) trata-se de DNA materno e não de DNA fetal (cffDNA). Pensa-se que este tenha origem em leucócitos ativados, que estão presentes em grande número na PE, refletindo o estado generalizado de inflamação materna. Os níveis de cfDNA no soro materno podem concomitantemente resultar de processos de coagulação sanguínea em que uma grande proporção de células sanguíneas maternas lizam, libertando maior quantidade de conteúdo de DNA genómico.³⁰

Relação entre DNA fetal livre e Pré-eclâmpsia

Aumento do DNA fetal livre na Pré-eclâmpsia

Vários estudos avaliaram os níveis de cffDNA em gravidezes complicadas por PE com o objetivo de obter conclusões em relação ao envolvimento deste biomarcador no desenvolvimento da doença. Após a descoberta de cffDNA por Lo et al em 1997, 2 anos depois, o mesmo grupo de investigadores comparou 20 grávidas pré-eclâmpticas com 20 grávidas controlo normotensas e demonstrou que os níveis de cffDNA no sangue materno estavam aumentados 5 vezes em relação ao grupo controlo (381 vs 76 genoma-equivalentes/mL, $P < 0.001$).³¹

Estes resultados foram posteriormente confirmados por muitos outros estudos incluindo os de Leung et al³² e Zhong et al³³ que obtiveram o mesmo aumento de cffDNA em grávidas com pré-eclâmpsia em relação ao grupo controlo. Recentemente, em 2018, Rafaeli et al declararam que mulheres com PE tinham uma concentração sérica materna mais alta (802 ng/ml, 400-2272 ng/ml) do que mulheres com uma gravidez normal (499 ng/ml, 0-1892 ng/ml, $p = 0,004$).²⁷

Tanto o cfDNA total como o cffDNA, isolados ou combinados e em diferentes semanas gestacionais, são descritos em inúmeros estudos, que chegam a conclusões semelhantes. Mulheres pré-eclâmpticas demonstram níveis mais altos, entre 1,5 a 4 vezes mais, em ambos os parâmetros, sobre o grupo controlo.³⁴⁻³⁸

Mais relevante ainda é mostrado que os níveis de cffDNA parecem já estar aumentados antes do aparecimento dos sintomas clínicos da doença nas grávidas que posteriormente desenvolvem PE.^{27,38-41}

Um estudo conduzido por Levine et al com 120 grávidas com PE e 120 grávidas controle normotensas, analisou os seus níveis de cffDNA em três períodos gestacionais diferentes (das 8-16 semanas, das 17-28 semanas e das 29-41 semanas) e demonstrou que em todos os períodos a média da concentração de cffDNA nos casos de PE foi mais do dobro da média nos controles, diferenças estas estatisticamente significativas.⁴⁰ Verificou também que existem duas fases de elevação de cffDNA nas mulheres que desenvolvem PE, sendo elas entre as 17 e 28 semanas e 3 semanas antes do desenvolvimento dos sintomas.⁴⁰

Cotter et al demonstraram que um aumento do cffDNA na circulação materna está presente numa fase precoce da gravidez de mulheres que irão desenvolver a doença posteriormente e que parece haver uma resposta gradual entre a quantidade de cffDNA e o risco de desenvolver PE.⁴¹ Demonstrou, portanto, que o risco e a severidade da doença estão dependentes dos níveis de cffDNA. Os seus resultados revelaram também que a presença de cffDNA no sangue materno está associado a um risco 8 vezes aumentado de desenvolvimento de PE.⁴¹

Independentemente destes vários estudos avaliaram a capacidade preditiva dos níveis de DNA total e fetal como marcadores do desenvolvimento de PE, não encontraram um valor de *cut-off* preciso sobre a associação de cffDNA com o diagnóstico de PE, gravidade da doença e a idade gestacional em que os níveis alterados deste biomarcador possam ser identificados.

Salvianti et al revelaram que tanto o cfDNA total como o fetal tiveram um bom desempenho diagnóstico na distinção entre mulheres com PE estabelecida com mulheres saudáveis do grupo controle. Ao comparar as grávidas em risco de desenvolver PE, que efetivamente desenvolveram com grávidas em risco mas que não desenvolveram, a capacidade preditiva foi satisfatória entre as 17 e 30 semanas. Isso permitiu estabelecer, dentro desse período, um valor *cut-off* de 735 GE/ml para o cfDNA total (sensibilidade de 87,5% e especificidade de 70,0%), e um valor de *cut-off* de 7,49 GE/ml para o cffDNA (100% de sensibilidade e 50% de especificidade).³⁵

Uma possível explicação para o aumento de cffDNA na PE inclui o aumento da libertação de cffDNA para a circulação materna e/ou a redução do *clearance* deste do plasma da grávida. O fígado e os rins têm um papel fundamental no *clearance* de cffDNA e como estes órgãos parecem estar patologicamente alterados na PE é provável que a sua capacidade de remover este biomarcador da circulação materna esteja diminuída. No entanto, este mecanismo será menos importante antes do desenvolvimento dos sintomas clínicos da doença, pois nesta fase, parecem não apresentar ainda anormalidades da função hepática ou renal.¹¹

As taxas de *turnover* celular e de apoptose do sinciciotrofoblasto estão significativamente aumentadas na PE,⁴¹ sendo o aumento de micropartículas sinciciotrofoblásticas específicas desta doença.⁴² A consequência deste processo é um aumento estável e constante do fluxo de material placentar para a circulação materna. Por esta razão, considera-se o cffDNA um marcador de isquemia placentar, o que explica a correlação direta entre as alterações degenerativas da placenta e os níveis deste biomarcador.⁴³ Estas alterações parecem ocorrer já no 1º trimestre da gravidez (1ª fase de elevação).²⁸ Quando a invasão do trofoblasto apenas oblitera parcialmente a porção apical das artérias uteroplacentares, permite que se desenvolva um fluxo patogénico intermitente do sangue materno para o espaço intervilloso, causando isquemia de reperfusão e stress oxidativo nos tecidos placentares.⁴⁰ Por outro lado, a elevação tardia de cffDNA (2ª fase de elevação) indica o começo da disfunção endotelial, que precede o início dos sintomas de PE, implicando que o DNA materno é libertado do endotélio danificado e que satura os recetores de macrófagos teciduais que metabolizam o DNA circulante. Por sua vez, isto diminui a taxa de eliminação e eleva a quantidade de DNA livre, incluindo cffDNA. De facto, o tempo de semivida do cffDNA após o parto foi 4 vezes maior em grávidas com PE.⁴⁰

Não obstante, é estudada a hipótese de o cffDNA existir em maiores quantidades em grávidas com PE, não como consequência da patofisiologia desta mas sendo este mesmo um participante ativo no desenvolvimento etiológico da doença. Sharfe-Nugent et al analisaram o potencial pró-inflamatório do DNA fetal humano e chegaram à conclusão que este causa a ativação do fator de transcrição NF-κB, levando à produção da citocina pró-inflamatória IL-6.⁴⁴ Adicionalmente, usando um modelo com ratos, estes investigadores concluíram que o DNA fetal é capaz de ativar TLR9 (uma classe de recetores que reconhece patogénios, capaz de iniciar uma resposta imunológica),⁴⁴ provocando uma reação inflamatória que poderá levar a uma perda fetal ou um pobre *outcome* na gravidez.⁴⁵ Este aumento de cffDNA provoca, portanto, uma resposta inflamatória sistémica em que a mulher responde exageradamente aos resíduos placentares.⁴⁵

DNA fetal livre na Pré-eclâmpsia Precoce/Severa vs. DNA fetal livre na Pré-eclâmpsia Tardia/Ligeira

Sifakis et al afirmam que a média dos níveis de cffDNA na circulação materna é maior nas grávidas que desenvolvem PE de início precoce em comparação com as grávidas controlo (95.5 genoma/equivalentes nos casos PE precoce vs 51.5 genoma/equivalentes nos controlos). No caso das grávidas que desenvolveram PE de início tardio, os níveis de cffDNA foram

semelhantes com os níveis das grávidas controlo (50.8 genoma/equivalentes nos casos PE tardia vs 51.5 genoma/equivalentes nos controlos). CffDNA parece já estar aumentado entre as 11-13 semanas de gestação nas grávidas que posteriormente desenvolvem a doença severa/precocidade.¹⁵

Recentemente, em 2016, AbdelHalim et al demonstrou um aumento da quantidade de cffDNA no sangue materno no grupo de grávidas que desenvolveram PE precocidade/severa em relação ao grupo que desenvolveu PE tardia/ligeira e em ambos os níveis foram consideravelmente maiores que no grupo controlo de grávidas normotensas (concentração de cffDNA em genoma/equivalentes de 518,94 nos casos PE severa vs. 201,55 no casos PE ligeira vs. 92,8 nos controlos).¹⁶ No grupo que desenvolveu PE severa a quantidade de cffDNA era aproximadamente 6 vezes maior que no grupo controlo e aproximadamente 2 vezes maior que o grupo que desenvolveu PE ligeira, conferindo uma diferença significativa entre os dois tipos de PE.¹⁶ Os valores de cffDNA estavam, portanto, relacionados com a severidade da doença.

Nabiel et al, em 2019, chegaram a conclusões semelhantes. Grávidas com PE severa mostraram níveis significativamente maiores de cffDNA do que as que apresentavam PE ligeira (564.62 ± 136.71 GE/ml vs 243.90 ± 78.21 GE/ml, respetivamente). Por outro lado, também as mulheres com PE de início precocidade obtiveram níveis superiores quando comparadas com as de início tardio (622.22 ± 116.82 GE/ml vs 284.08 ± 121.72 GE/ml, respetivamente).³⁸ O presente estudo mostrou que a sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo do cffDNA foram 97,5%, 93,8%, 94,0%, 97,4% e 95,6% respetivamente.³⁸

Estes resultados parecem confirmar que os níveis de cffDNA poderão realmente estar associados ao grau de má perfusão placentar e à severidade da própria doença.¹⁵

Admite-se que a PE precocidade (<34 semanas) e a PE tardia (>34 semanas) tenham diferentes etiologias e mecanismos fisiopatológicos, daí a sua diferente expressão clínica.^{4,46}

Na PE precocidade existe uma evidência clara de isquemia placentar, com invasão incompleta/anormal das artérias espiraladas maternas no início da gravidez e aumento da apoptose dos sinciotrofoblastos.⁴⁵ ⁴ Esta está normalmente associada a restrição do crescimento intrauterino.²

Por outro lado, na PE de início tardio, há pouca evidência que aponte para uma redução do *remodeling* das artérias espiraladas, bem como da perfusão placentar, podendo o fluxo sanguíneo estar até aumentado.⁴ Esta é considerada uma síndrome materna de disfunção endotelial sistémica em que ocorre uma placentação normal.⁴⁵ Pensa-se que poderá estar relacionada com uma predisposição genética materna para doença cardiovascular, ou outras doenças como diabetes ou hipertensão que se poderão manifestar como PE num estado de gravidez.^{2,4}

DNA fetal livre sem relação com a Pré-eclâmpsia

Um pequeno número de estudos contradiz os resultados obtidos pelos anteriores. Em 2007, Crowley et al demonstraram que não havia diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de cffDNA nas grávidas com PE e nas grávidas controlo e que estes não se correlacionavam com a atividade da doença (quantificação de cff-DNA em GE/mL: 30,5 em casos de PE vs. 27,5 em controlos).⁴⁷

Da mesma forma, também Silver et al, em 2016, chegaram à conclusão que não há diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de cffDNA no primeiro trimestre em mulheres que subsequentemente desenvolvem PE em relação às grávidas controlo normotensas. Os níveis de cfDNA total no primeiro trimestre parecem estar aumentados em Afro-americanas e Hispânicas em comparação com grávidas Caucasianas, por outro lado, parecem estar diminuídos com o aumento do IMC e em fumadoras.⁴⁸

Diferenças de resultados entre os estudos podem dever-se à idade gestacional no momento da avaliação, ao tipo de população estudada ou aos métodos utilizados para a deteção dos níveis de cffDNA.

Conclusão

Segundo a literatura disponível os níveis de cffDNA estão aumentados nas grávidas com PE quando comparados com os níveis em grávidas normotensas. Estes parecem estar aumentados antes do aparecimento dos sintomas clínicos da doença, principalmente nos casos de PE severa/precoce. Desta forma, medir os níveis cffDNA poderá ajudar a rastrear grávidas que possam desenvolver PE precoce/severa, antes da expressão fenotípica da doença, permitindo assim, a implementação de medidas preventivas nas grávidas de risco.

DNA fetal livre é considerado um marcador promissor de PE há mais de 10 anos⁴⁹, estando a sua positividade relacionada com a severidade da doença,³⁸ no entanto, muita investigação tem sido feita sobre a possibilidade de este poder ser usado como biomarcador no rastreio da doença, sendo os dados ainda não totalmente conclusivos.⁵⁰ De facto, surpreendentemente ainda não se definiu ou calculou um *cut-off* específico que permitisse o rastreio de PE.⁴¹ Posteriormente seria necessário integrá-lo num modelo de multivariáveis, como já realizado anteriormente para outros biomarcadores,⁴¹ como o Rácio sFlt-1/PIGF.

As dificuldades técnicas e o elevado custo económico são consideradas o maior impedimento à aplicabilidade deste marcador na prática clínica,⁵⁰ não permitindo a sua ampla reprodutibilidade.¹⁵ Um bom teste de rastreio deve ter alta sensibilidade, ser acessível, facilmente aceite pelo doente e custo-efetivo. É necessário portanto, melhorar as suas características para que possa ser aplicado.

Contudo, dado o poder estatístico alcançado pelos estudos anteriormente apresentados é esperado que o cffDNA possa potencialmente vir a ser usado como marcador preditivo para PE precoce mas não para PE tardia.

Um possível benefício na identificação precoce de gravidezes de alto risco de desenvolver a doença seria a implementação de vigilância mais apertada e a possibilidade de uso de aspirina, em baixa dose, profilática.⁵¹ Todavia, dado a idade gestacional da grávida na altura do rastreio, o possível impacto na prevenção da PE é questionável.¹⁰

O futuro das possíveis aplicabilidades de cffDNA é muito vasto, sendo por isso necessário continuar a investigar este biomarcador para que possamos continuar a avançar no mundo do diagnóstico pré-natal.

Anexos

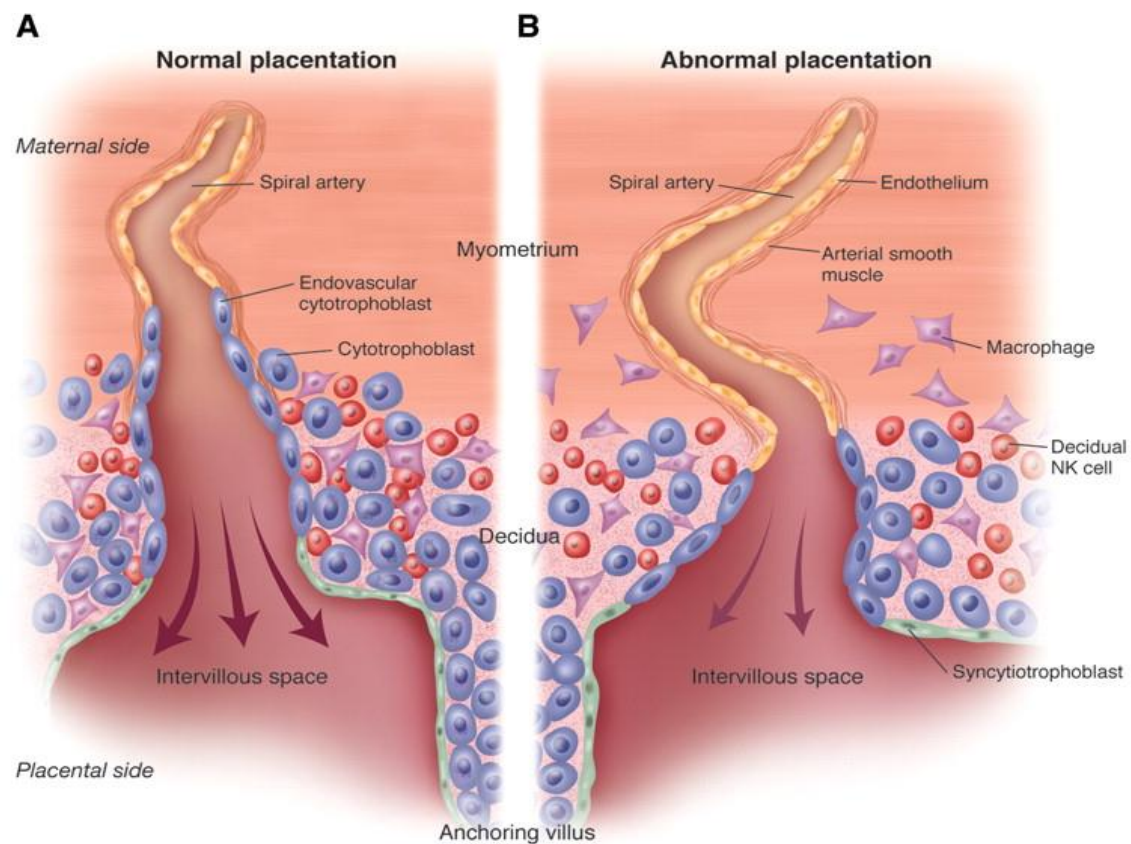


Figura 1 - Alterações placentares e Pré-eclâmpsia. Placentação Normal (A) e Placentação Anormal (B) entre as 15-16 semanas de gravidez. Durante a placentação normal, os citotrofoblastos (azuis) atravessam a placenta e invadem a decídua materna e as artérias espiraladas adjacentes. Estes penetram a parede vascular arterial e substituem parte do endotélio materno (amarelo), estimulando o remodeling da parede arterial de tal forma que o músculo liso desaparece e as artérias dilatam. Na decídua existem também células NK (vermelho) e macrófagos (roxo). Durante a gravidez normal, estas células imunes facilitam a invasão profunda do citotrofoblasto no miométrio e promovem o remodeling das artérias espiraladas (A). Na pré-eclâmpsia, esta invasão é restringida conduzindo a alteração do remodeling arterial.¹

(utilização de figura autorizado pelo autor)

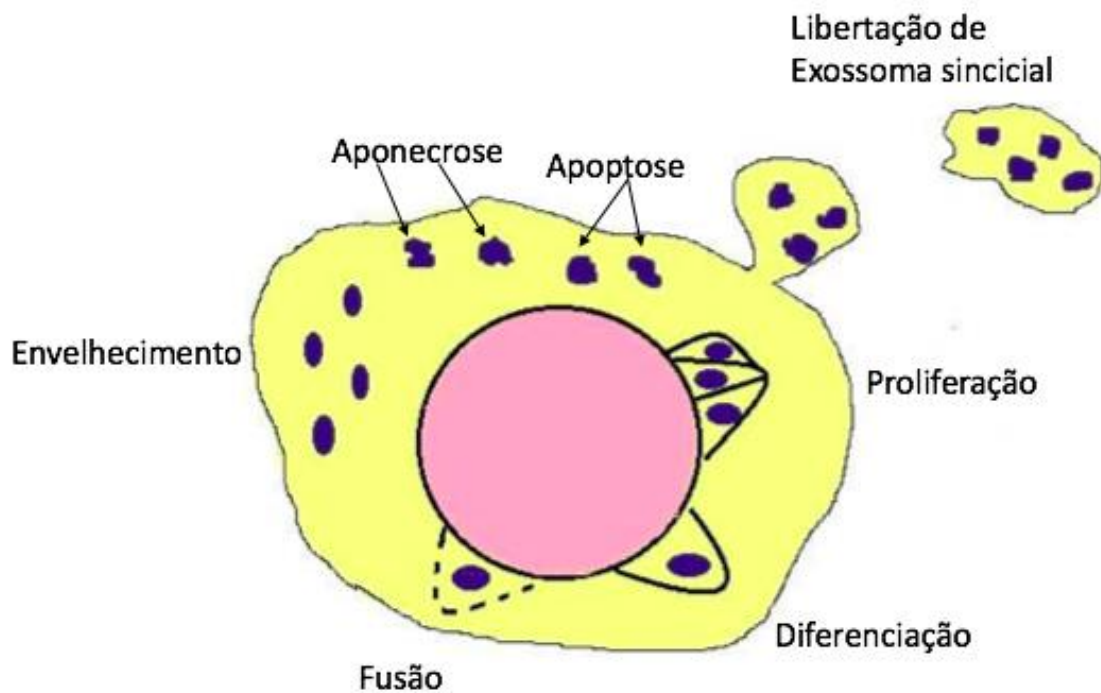


Figura 3 - Liberação de DNA fetal. Mecanismos de liberação de fragmentos trofoblásticos para a circulação maternal. O citotrofoblasto prolifera e diferencia-se durante o desenvolvimento fetal. Posteriormente, este funde-se com o sinciotrofoblasto e por fim, envelhece, sendo aglomerado em material apoptótico e libertado na circulação materna, na forma de exossomas. Por vezes, ocorre aponecrose quando a cascata apoptótica falha e material necrótico é libertado na circulação materna⁵².

Tabela de Resultados

Tabela 1 – Relação de DNA fetal e Pré-eclâmpsia

Estudos	Ano de Publicação	Desenho do estudo	Tamanho da amostra	Idade Gestacional (semanas)	Relação do cffDNA com PE	Limitações	Relação estatística
Leung et al. ³²	2001	Caso-controlo	18 pré-eclâmpsia 33 controlos	11-22 semanas	Concentração DNA fetal em GE/ml: 41,9 em casos vs. 22,0 em controlos.	Amostra pequena. Apenas estudadas grávidas com feto masculino (só identificado DNA fetal pelo cromossoma Y).	Sim
Zhong et al. ³³	2002	Caso-controlo	10 pré-eclâmpsia 40 controlos	20 semanas	Níveis DNA fetal livre, em cópias/ml: 442,9 em casos vs. 128,5 em controlos.	Amostra pequena. Apenas estudadas grávidas com feto masculino (só identificado DNA fetal pelo cromossoma Y).	Sim
Levine et al. ⁴⁰	2004	Caso-controlo	120 pré-eclâmpsia 120 controlos	8-20, 26-29, 36, e com o aparecimento de HT ou proteinúria	Concentração de cff-DNA (GE/ml):	Apenas estudadas grávidas com feto masculino (só identificado DNA fetal pelo cromossoma Y).	Sim
					Entre 29-41 semanas: 219 em casos com PE vs. 112 em controlos.		Sim
					Antes do desenvolvimento de PE, entre 17-28 semanas: 36 em casos vs. 16 em controlos.		Sim
					3 semanas antes do desenvolvimento de PE (entre 29-41 semanas): 176 em casos vs. 75 em controlos.		Sim
Cotter et al. ⁴¹	2004	Caso-controlo	88 pré-eclâmpsia 176 controlos	Média 15,7 Semanas ($\pm$ 3,6 semanas)	Quantificação DNA fetal pelo gene B-actina: 280 cópias/ml em casos com PE vs. 28 cópias/ml em controlos.	As amostras de plasma utilizado eram congeladas. Apenas estudadas grávidas com feto masculino (só identificado DNA fetal pelo cromossoma Y).	Não
					Quantificação DNA fetal por gene SRY (cópias/ml) quando dividida em quartis: cada quartil está associado a um aumento de 3x o risco de desenvolver a doença, (OR 3.1,		Sim

					95%CI 2.1-4.5).		
Crowley et al. ⁴⁷	2007	Caso-controlo	16 pré-eclâmpsia 72 controlos	10-20 semanas (média de 13,5)	Quantificação DNA fetal pelo gene B-actina: 2025 GE/ml em casos com PE vs. 1835 GE/ml em controlos. Quantificação DNA fetal pelo gene SRY: 30,5 GE/ml em casos com PE vs. 27,5 GE/ml em controlos.	Amostras foram ultracentrifugadas e conservadas a uma temperatura de -20°C. Apenas estudadas grávidas com feto masculino. Usada uma única cópia de gene SRY como marcador fetal em vez de uma sequência de multicópias do cromossoma Y como DYS14 (mais preciso). Média de idade gestacional inferior à maioria dos estudos. Amostra pequena. Amostras de plasma colhidas apenas uma vez no tempo.	Não Não
Illanes et al. ²⁸	2009	Caso-controlo	9 pré-eclâmpsia com parto a ocorrer <35 semanas e 15 pré-eclâmpsia com parto a ocorrer ≥35 semanas. 24 controlos.	11-14 semanas	Quantidade de cff-DNA em grávidas cujo parto ocorreu >35 semanas: 2,23 GE/ml em casos vs. 1,61 GE/ml em controlos. Quantidade de cff-DNA em grávidas cujo parto ocorreu <35 semanas: 4,34 GE/ml em casos com <35 semanas vs. 1,61 GE/ml em controlos.	Amostra pequena. Apenas estudadas grávidas com feto masculino (só identificado DNA fetal pelo cromossoma Y).	Não Sim
Sifakis et al. ¹⁵	2009	Caso-controlo	44 desenvolveram pré-eclâmpsia: 11 precoce (parto a ocorrer <34 semanas) e 33 tardia (parto a ocorrer ≥34 semanas). 176 controlos.	11-13 semanas	Média da quantidade de cff-DNA (GE/ml): 51.5 nos controlos vs 95.5 em casos PE precoce vs 50.8 em casos PE tardia	Apenas estudadas grávidas com feto masculino (só identificado DNA fetal pelo cromossoma Y).	Sim (para PE precoce)
Poon et al. ⁵³	2013	Caso-controlo	46 pré-eclâmpsia 1805 controlos	11-13 semanas	Quantidade de cff-DNA (GE/ml): 12,87 em casos de PE vs. 13,29 em controlos.	As amostras de plasma utilizado eram congeladas.	Não
Jakobsen et al. ³⁶	2013	Cohort retrospectivo	23 PE ligeira 15 PE severa 982 controlos	11-39 semanas	Odds Ratio de desenvolver PE ligeira de 3.6 se os níveis de cff-DNA forem < que percentil 5% em comparação com níveis de cff-DNA >5%. Odds Ratio de desenvolver PE severa de 8.1 se cff-DNA acima do percentil > 90% em comparação com cff-DNA abaixo do percentil 90%.	Amostras analisadas entre 2 a 7 dias após a colheita. Amostra pequena.	Sim

Yu et al. ⁵⁴	2013	Caso- controlo	20 pré-eclâmpsia (<34 semanas) 20 controlos	2º trimestre, média 17-18 semanas	Logaritmo de cffDNA: 3,18 em casos PE vs. 1,79 em controlos. Limite cut-off de nível de cff-DNA (logaritmo) de 2,62 para o qual a sensibilidade é 90% e a especificidade 85% que discrimina entre casos de risco de desenvolver PE e casos normais.	Apenas estudadas grávidas com feto masculino (só identificado DNA fetal por gene específico do cromossoma Y). Amostra pequena.	Sim
Stein et al. ⁵⁵	2013	Cohort	44 pré-eclâmpsia 567 controlos	Média 25 semanas	Valores de PCR em tempo real como marcador de concentração de cff- DNA: 35,02 em casos com PE vs 34,83 em controlos. (p: 0.358)	Apenas participaram grávidas Rh negativo com fetos Rh positivo. Falta de casos com PE ligeira. A metodologia com PCR em tempo real não é precisa e sensível o suficiente para detetar pequenas diferenças entre os grupos.	Não
Kim et al. ³⁹	2013	Cohort retrospectivo	1ºtrimestre: 4 pré-eclâmpsia 36 controlos 2ºtrimestre: 5 pré-eclâmpsia 78 controlos 3ºtrimestre: 20 pré-eclâmpsia 115 controlos	7-41 semanas	Concentração de RASSF1A hipermetilado total no plasma materno após digestão BstU I (cópias/ml) 1ºtrimestre: 60,2 nos controlo vs 119,6 nos casos (p>0,05). 2ºtrimestre: risco 3,3x maior nos casos de PE que nos controlos; 60,1 nos controlo vs 188,8 nos casos; p < 0.001. 3ºtrimestre: 256,8 nos controlo vs 782,0 nos casos (p<0.001).	Amostra pequena e obtida por método não paramétrico. Sobreposição de resultados entre os doentes do grupo controlo e os doentes dos casos.	Não Sim Sim
Papantoniou et al. ³⁷	2013	Caso- controlo	24 pré-eclâmpsia 48 controlos	11-13 semanas	Média da quantidade de cf- DNA (GE/ml): 9402 nos casos vs 2698 nos controlos. Média da quantidade de cff- DNA (GE/ml): 934.5 nos casos vs 62 nos controlos. Definido valor de cut-off de 7486 Eq/mL para cf-DNA e 512 Eq/mL para cff- DNA.	Amostra pequena. Usados genes diferentes para a quantificação de cff- DNA. Viés de seleção do grupo controlo.	Sim Sim

Rolnik et al. ⁵¹	2015	Caso-controlo	20 pré-eclâmpsia com <34 semanas 200 controlos 20 pré-eclâmpsia com ≥34 semanas 100 controlos	1º trimestre: 11-13 semanas 2º trimestre: 20-24 semanas	Fração fetal: 6.8 vs. 8.7% no primeiro trimestre para pre-eclâmpsia < 34 semanas. Fração fetal: 8.2 vs. 9.7% no segundo trimestre para pre-eclâmpsia > 34 semanas.	Heterogenicidade dos casos e dos controlos em termos de fenótipo da doença, patofisiologia e severidade.	Não, após ajustamento de confundidores
Salvianti et al. ³⁵	2015	Estudo Longitudinal	73 controlos; 17 com PE; 9 em risco de desenvolver PE e que mais tarde desenvolveram; 24 em risco de desenvolver PE mas que não desenvolveram.	17-30 semanas	Concentração de cfDNA em GE/ml: 3900 em doentes com PE; 1022 em doentes em risco de desenvolver PE e que mais tarde desenvolveram a doença; 579 em mulheres em risco de desenvolver PE mas que não desenvolveram e 347 nos controlos.	Amostra pequena. Dificuldade em distinguir os diferentes tipos de PE.	Sim
AbdelHalim et al. ¹⁶	2016	Cohort	107 casos com pré-eclâmpsia (51 com PE ligeira e 56 com PE severa). 93 controlos.	27-40 semanas	Concentração de cfDNA em GE/ml: 518,94 nos casos PE severa vs. 201,55 nos casos PE ligeira vs. 92,8 nos controlos.	Apenas estudados casos no 3º trimestre. Amostra pequena.	Sim
Silver et al. ⁴⁸	2016	Caso-controlo	175 casos que desenvolveram pré-eclâmpsia 175 controlos	11.3 +/- 1.1 semanas	Níveis de cff-DNA: 3.52 em grávidas que desenvolveram PE vs. 3.74 em controlos	Não foi detetado cfDNA em muitas amostras: o anticoagulante utilizado no plasma não foi o ideal; as amostras não foram centrifugadas 2 vezes; quantidade de plasma não suficiente.	Não
Rafaeli et al. ²⁷	2018	Estudo transversal	21 pré-eclâmpsia 39 controlos	34.9 ± 4 semanas	Concentração de cffDNA em ng/ml: 802 nos casos vs. 499 nos controlos.	Amostra pequena.	Sim
Bender et al. ⁵⁶	2018	Cohort retrospectivo	10-14 semanas: 172 pré-eclâmpsia 1833 controlos. 14.1-20 semanas: 49 pré-eclâmpsia 481 controlos	10-20 semanas	A relação entre fração fetal e doenças hipertensivas da gravidez não foi estatisticamente significativa.	Não foi possível identificar que doentes tinham antecedentes de doenças hipertensivas em gravidezes anteriores. Não foi possível identificar se alguns doentes faziam baixa dose de aspirina como prevenção de PE. Apenas estudadas mulheres entre as 10-20 semanas de idade gestacional.	Não, após ajustamento de confundidores
Nabiel et al. ³⁸	2019	Caso-controlo	80 pré-eclâmpsia (51 pré-eclâmpsia ligeira; 29 pré-eclâmpsia severa/ 18 início precoce e 62 início tardio da doença) 80 controlos	21-38 semanas	Concentração de cffDNA em GE/ml: 564,62 nos casos PE severa vs. 243.90 nos casos PE ligeira. 622.22 nos casos de PE de início precoce vs. 284.08 nos casos de PE de início tardio. Vs. 142.80 nos controlos.	Apenas estudadas grávidas com feto masculino (pois deteção de cffDNA dependia da deteção do cromossoma Y). Resultados não foram validados.	Sim

Bibliografia

1. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005;308:1592-4.
2. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension* 2008;51:970-5.
3. Litton C, Stone J, Eddleman K, Lee MJ. Noninvasive prenatal diagnosis: past, present, and future. *Mt Sinai J Med* 2009;76:521-8.
4. Armaly Z, Jadaon JE, Jabbour A, Abassi ZA. Preeclampsia: novel mechanisms and potential therapeutic approaches. *Frontiers in physiology* 2018;9.
5. Phipps E, Prasanna D, Brima W, Jim B. Preeclampsia: updates in pathogenesis, definitions, and guidelines. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2016;11:1102-13.
6. Mayrink J, Costa ML, Cecatti JG. Preeclampsia in 2018: Revisiting Concepts, Physiopathology, and Prediction. *TheScientificWorldJournal* 2018;2018:6268276.
7. Hahn S, Rusterholz C, Hosli I, Lapaire O. Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia. *Placenta* 2011;32 Suppl:S17-20.
8. Hund M, Allegranza D, Schoedl M, Dilba P, Verhagen-Kamerbeek W, Stepan H. Multicenter prospective clinical study to evaluate the prediction of short-term outcome in pregnant women with suspected preeclampsia (PROGNOSIS): study protocol. *BMC pregnancy and childbirth* 2014;14:324.
9. Hahn S, Huppertz B, Holzgreve W. Fetal cells and cell free fetal nucleic acids in maternal blood: new tools to study abnormal placentation? *Placenta* 2005;26:515-26.
10. Contro E, Bernabini D, Farina A. Cell-Free Fetal DNA for the Prediction of Pre-Eclampsia at the First and Second Trimesters: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Molecular diagnosis & therapy* 2017;21:125-35.
11. Sifakis S, Koukou Z, Spandidos DA. Cell-free fetal DNA and pregnancy-related complications (review). *Mol Med Rep* 2015;11:2367-72.
12. Stepan H, Herraiz I, Schlembach D, et al. Implementation of the sFlt-1/PlGF ratio for prediction and diagnosis of pre-eclampsia in singleton pregnancy: implications for clinical practice. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 2015;45:241-6.
13. Zeisler H, Llurba E, Chantraine F, et al. Predictive value of the sFlt-1: PlGF ratio in women with suspected preeclampsia. *New England Journal of Medicine* 2016;374:13-22.
14. Konecna B, Borbelyova V, Celec P, Vlkova B. Does rat fetal DNA induce preeclampsia in pregnant rats? *J Dev Orig Health Dis* 2015;6:5-9.
15. Sifakis S, Zaravinos A, Maiz N, Spandidos DA, Nicolaides KH. First-trimester maternal plasma cell-free fetal DNA and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2009;201:472 e1-7.
16. AbdelHalim RM, Ramadan DI, Zeyada R, Nasr AS, Mandour IA. Circulating Maternal Total Cell-Free DNA, Cell-Free Fetal DNA and Soluble Endoglin Levels in Preeclampsia: Predictors of Adverse Fetal Outcome? A Cohort Study. *Mol Diagn Ther* 2016;20:135-49.
17. Martin A, Krishna I, Badell M, Samuel A. Can the quantity of cell-free fetal DNA predict preeclampsia: a systematic review. *Prenat Diagn* 2014;34:685-91.
18. Mustafa R, Ahmed S, Gupta A, Venuto RC. A comprehensive review of hypertension in pregnancy. *Journal of pregnancy* 2012;2012.
19. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biology of reproduction* 2003;69:1-7.

20. Roberts JM. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Seminars in reproductive endocrinology*; 1998: Copyright© 1998 by Thieme Medical Publishers, Inc. p. 5-15.
21. Escudero C, Roberts JM, Myatt L, Feoktistov I. Impaired adenosine-mediated angiogenesis in preeclampsia: potential implications for fetal programming. *Frontiers in pharmacology* 2014;5:134.
22. Taylor RN, Davidge ST, Roberts JM. Endothelial cell dysfunction and oxidative stress. *Chesley's hypertensive disorders in pregnancy*: Elsevier; 2009:143-67.
23. Oggé G, Romero R, Chaiworapongsa T, et al. Leukocytes of pregnant women with small-for-gestational age neonates have a different phenotypic and metabolic activity from those of women with preeclampsia. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 2010;23:476-87.
24. Gupta A, Hasler P, Gebhardt S, Holzgreve W, Hahn S. Occurrence of neutrophil extracellular DNA traps (NETs) in pre-eclampsia: a link with elevated levels of cell-free DNA? *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;1075:118-22.
25. Bianchi DW. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review. *Placenta* 2004;25 Suppl A:S93-s101.
26. Masuzaki H, Miura K, Yoshiura KI, Yoshimura S, Niikawa N, Ishimaru T. Detection of cell free placental DNA in maternal plasma: direct evidence from three cases of confined placental mosaicism. *J Med Genet* 2004;41:289-92.
27. Rafaeli-Yehudai T, Imterat M, Douvdevani A, et al. Maternal total cell-free DNA in preeclampsia and fetal growth restriction: Evidence of differences in maternal response to abnormal implantation. *PLoS One* 2018;13:e0200360.
28. Illanes S, Parra M, Serra R, et al. Increased free fetal DNA levels in early pregnancy plasma of women who subsequently develop preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn* 2009;29:1118-22.
29. Huppertz B, Kingdom JC. Apoptosis in the trophoblast—role of apoptosis in placental morphogenesis. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 2004;11:353-62.
30. Kaufmann I, Rusterholz C, Hösli I, Hahn S, Lapaire O. Can detection of late-onset PE at triage by sflt-1 or PlGF be improved by the use of additional biomarkers? *Prenatal diagnosis* 2012;32:1288-94.
31. Lo YM, Leung TN, Tein MS, et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 1999;45:184-8.
32. Leung TN, Zhang J, Lau TK, Chan LY, Lo YM. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clin Chem* 2001;47:137-9.
33. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. The levels of circulatory cell free fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2002;21:77-83.
34. Farina A, Sekizawa A, Rizzo N, et al. Cell-free fetal DNA (SRY locus) concentration in maternal plasma is directly correlated to the time elapsed from the onset of preeclampsia to the collection of blood. *Prenat Diagn* 2004;24:293-7.
35. Salvianti F, Inversetti A, Smid M, et al. Prospective evaluation of RASSF1A cell-free DNA as a biomarker of pre-eclampsia. *Placenta* 2015;36:996-1001.
36. Jakobsen TR, Clausen FB, Rode L, Dziegiel MH, Tabor A. Identifying mild and severe preeclampsia in asymptomatic pregnant women by levels of cell-free fetal DNA. *Transfusion* 2013;53:1956-64.
37. Papantoniou N, Bagiokos V, Agiannitopoulos K, et al. RASSF1A in maternal plasma as a molecular marker of preeclampsia. *Prenatal diagnosis* 2013;33:682-7.

38. Nabil Y, Mosbah A. Maternal Serum sEndoglin and Cell-Free Fetal DNA as Probable Markers of Preeclampsia: A Study in Single Center, Egypt. *Immunological investigations* 2019;1-10.
39. Kim M, Kim S, Park S, Ahn H, Chung J, Ryu H. Association of fetal-derived hypermethylated RASSF1A concentration in placenta-mediated pregnancy complications. *Placenta* 2013;34:57-61.
40. Levine RJ, Qian C, Leshane ES, et al. Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:707-13.
41. Cotter AM, Martin CM, O'Leary J J, Daly SF. Increased fetal DNA in the maternal circulation in early pregnancy is associated with an increased risk of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:515-20.
42. Goswami D, Tannetta D, Magee L, et al. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta* 2006;27:56-61.
43. Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi DW, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-placental DNA. *The American journal of pathology* 2006;169:400-4.
44. Scharfe-Nugent A, Corr SC, Carpenter SB, et al. TLR9 provokes inflammation in response to fetal DNA: mechanism for fetal loss in preterm birth and preeclampsia. *The Journal of Immunology* 2012;188:5706-12.
45. Yuen RK, Penaherrera MS, Von Dadelszen P, McFadden DE, Robinson WP. DNA methylation profiling of human placentas reveals promoter hypomethylation of multiple genes in early-onset preeclampsia. *European Journal of Human Genetics* 2010;18:1006.
46. Oudejans CB, van Dijk M, Oosterkamp M, Lachmeijer A, Blankenstein MA. Genetics of preeclampsia: paradigm shifts. *Human genetics* 2007;120:607-12.
47. Crowley A, Martin C, Fitzpatrick P, et al. Free fetal DNA is not increased before 20 weeks in intrauterine growth restriction or pre-eclampsia. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis* 2007;27:174-9.
48. Silver RM, Myatt L, Hauth JC, et al. Cell-Free Total and Fetal DNA in First Trimester Maternal Serum and Subsequent Development of Preeclampsia. *Am J Perinatol* 2017;34:191-8.
49. Gracheva M, Kan N, Krasniy A. Role of cell-free fetal DNA in the early diagnosis of pregnancy complications. *Akush Ginekol* 2016;10:5-11.
50. Krasnyi AM, Gracheva MI, Sadekova AA, et al. Complex Analysis of Total and Fetal DNA and Cytokines in Blood Plasma of Pregnant Women with Preeclampsia. *Bull Exp Biol Med* 2018;164:721-5.
51. Rolnik D, O'gorman N, Fiolna M, Van den Boom D, Nicolaides K, Poon L. Maternal plasma cell-free DNA in the prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 2015;45:106-11.
52. Sifakis S, Koukou Z, Spandidos DA. Cell-free fetal DNA and pregnancy-related complications. *Molecular medicine reports* 2015;11:2367-72.
53. Poon L, Musci T, Song K, Syngelaki A, Nicolaides K. Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to fetal and maternal characteristics and pregnancy outcomes. *Fetal diagnosis and therapy* 2013;33:215-23.
54. Yu H, Shen Y, Ge Q, et al. Quantification of maternal serum cell-free fetal DNA in early-onset preeclampsia. *Int J Mol Sci* 2013;14:7571-82.

55. Stein W, Müller S, Gutensohn K, Emons G, Legler T. Cell-free fetal DNA and adverse outcome in low risk pregnancies. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2013;166:10-3.
56. Bender WR, Koelper NC, Sammel MD, Dugoff L. Association of Fetal Fraction of Cell-Free DNA and Hypertensive Disorders of Pregnancy. *Am J Perinatol* 2018.

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL

