

ARTÍCULO ORIGINAL

ORIGINAL PAPER

1. Servicio de Obstetricia y Ginecología, Maternidad "Dr. Nerio Belloso", Hospital Central "Dr. Urquinaona", Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.
2. Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
 - a Especialista en Ginecología y Obstetricia.
 - b Docente.

Responsabilidades éticas y conflictos de interés

Reconocimiento de autoría: todos los autores declaran que han realizado aportes a la idea, diseño del estudio, recolección de datos, análisis e interpretación de datos, revisión crítica del contenido intelectual y aprobación final del manuscrito que estamos enviando

Responsabilidades éticas: protección de personas. Los autores declaramos que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki de 1975 en su versión más actual.

Confidencialidad de los datos: los autores declaramos que hemos seguido los protocolos establecidos por sus respectivos centros sanitarios para acceder a los datos de las historias clínicas del hospital central "dr. Urquinaona", Maracaibo, Venezuela sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado: los autores hemos obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo a los fines de poder realizar este tipo de publicación con finalidad de investigación/divulgación en soporte papel y en internet para la comunidad científica. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Conflicto de intereses: los autores declaramos no tener ningún conflicto de intereses.

Recibido: 16 octubre 2016

Evaluado: 1 diciembre 2016

Aceptado: 11 diciembre 2016

Correspondencia:

Dr. Eduardo Reyna-Villasmil.

Hospital Central "Dr. Urquinaona"

Final Av. El Milagro, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

58162605233

sippenbauch@gmail.com

Citar como: Reyna-Villasmil E, Mejía-Montilla J, Santos-Bolívar J, Torres-Cepeda D, Reyna-Villasmil N, Fernández-Ramírez A. Angiopoyetina-2 plasmática en el segundo trimestre, como predictor del desarrollo de preeclampsia. Rev Peru Ginecol Obstet. 2017;63(1):11-18.

Angiopoyetina-2 plasmática en el segundo trimestre, como predictor del desarrollo de preeclampsia

Plasma angiopoietin-2 in the second trimester as a predictor of the development of preeclampsia

Eduardo Reyna-Villasmil^{1,a}, Jorly Mejía-Montilla^{2,b}, Joel Santos-Bolívar^{1,a}, Duly Torres-Cepeda^{1,a}, Nadia Reyna-Villasmil^{2,b}, Andreina Fernández-Ramírez^{2,b}

RESUMEN

Objetivo. Establecer la utilidad de las concentraciones plasmáticas de angiopoyetina-2 en el segundo trimestre del embarazo, como predictor del desarrollo de preeclampsia. **Diseño.** Estudio de casos y controles. **Institución.** Hospital Central "Dr. Urquinaona", Maracaibo, Venezuela. **Participantes.** Gestantes nulíparas. **Intervenciones.** Estudio de 504 pacientes nulíparas con embarazos simples entre 17 y 20 semanas que acudieron a la consulta prenatal. Se consideró casos a 41 embarazadas que desarrollaron preeclampsia (grupo A) y controles del grupo B (19,7 +/- 5,9 ng/mL; p < 0,0001). Un valor de corte de 22 ng/mL presentó un valor por debajo de la curva de 0,77 y sensibilidad del 75,6%, especificidad 58,5%, valor predictivo positivo 14,2% y valor predictivo negativo 96,5%. **Conclusión.** Las concentraciones plasmáticas de angiopoyetina-2 en el segundo trimestre pueden predecir el desarrollo de preeclampsia.

Palabras claves. Angiopoyetina-2; Preeclampsia, Predicción.

ABSTRACT

Objective: To establish the usefulness of plasma concentrations of angiopoietin-2 in the second trimester of pregnancy as a predictor of the development of preeclampsia. **Design:** Case-control study. **Setting:** Hospital Central "Dr. Urquinaona", Maracaibo, Venezuela. **Participants:** Nulliparous pregnant women. **Interventions:** 504 nulliparous women between 17-20 weeks pregnant who assisted to prenatal control were studied; 41 developed preeclampsia and were considered cases (group A) and 463 did not develop preeclampsia and were considered controls (group B). **Main outcome measures:** General characteristics, plasma angiopoietin-2 concentrations and prognosis efficacy. **Results:** There were no significant differences in maternal age, gestational age and systolic and diastolic blood pressure at the moment of ultrasound evaluation (p = ns). Gestational age at diagnosis of preeclampsia in group A was 35.0 +/- 3.2 weeks. There were significant differences in plasma angiopoietin-2 concentration values between patients in group A (26.0 +/- 4.7 ng/mL) and patients in group B (19.7 +/- 5.9 ng/mL; p < 0.0001). A cut-off value of 22 ng/mL had a value under the curve of 0.77, a sensitivity of 75.6%, a specificity of 58.5%, a positive predictive value of 14.2% and a negative predictive value of 96.5%. **Conclusion:** Plasma angiopoietin-2 concentrations in the second trimester of pregnancy could predict the development of preeclampsia.

Keywords: Angiopoietin-2; Preeclampsia; Prediction



INTRODUCCIÓN

La preeclampsia es un síndrome caracterizado por hipertensión y proteinuria. Produce complicaciones y mortalidad materna y fetal alrededor de 5% de las gestaciones mayores de 20 semanas⁽¹⁾. Se conoce que diversos factores, como la isquemia placentaria, disfunción endotelial, alteraciones de las sustancias vasoactivas, están involucradas en el desarrollo de la preeclampsia⁽²⁾. La hipoxia placentaria es secundaria a la inadecuada invasión trofoblástica y remodelación de las arterias espirales uterinas, llevando a disfunción endotelial materna⁽³⁾.

Las angiopoyetinas (angiopoyetina 1 y angiopoyetina 2) actúan durante las fases finales de la angiogénesis moldeando el desarrollo de la vasculatura sanguínea y linfática. La angiopoyetina (ANG)-1 tiene una actividad mitogénica débil, causa la maduración de células endoteliales y estabilización tisular. La ANG-2 es el antagonista natural del ANG-1 en las células endoteliales, inhibe la estabilización y la maduración vascular, lo que permite mayor plasticidad endotelial y mejor respuesta ante el estímulo del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)^(4,5). La ANG-1 y ANG-2 se unen al mismo receptor 2 de cinasa de tirosina (Tie-2) específico de las células endoteliales y hematopoyéticas, el cual es activado por la ANG-1 y bloqueado por la ANG-2⁽⁶⁾.

En la preeclampsia, se considera que los cambios en los factores de crecimiento angiogénicos preceden a las manifestaciones clínicas. Se ha descrito que las concentraciones de factor de crecimiento placentario y endoglinas están disminuidas entre las 14 y 21 semanas⁽⁷⁾. Se ha demostrado la presencia de concentraciones significativamente más bajas de ANG-2 durante el tercer trimestre en preeclámpicas comparado con embarazadas sanas⁽⁸⁾. Las concentraciones plasmáticas de ANG-2 en las embarazadas sanas son marcadamente más elevadas al compararlas con mujeres no embarazadas y regresan a valores similares a los de las controles no embarazadas después del parto. Se ha propuesto un papel clave para la ANG-2 en el desarrollo del embarazo y la aparición de las complicaciones⁽⁹⁾, pero los cambios en las concentraciones plasmáticas en las embarazadas antes del desarrollo de la preeclampsia aún no han sido completamente evaluados.

El objetivo de la investigación fue establecer la utilidad de las concentraciones plasmáticas de angiopoyetina-2 en el segundo trimestre como predictor del desarrollo de preeclampsia.

MÉTODOS

Se realizó un trabajo prospectivo observacional en pacientes nulíparas con embarazos simples que fueron atendidas en la consulta prenatal ambulatoria del Hospital Central "Dr. Urquinaona", Maracaibo, Venezuela, entre enero de 2012 y marzo de 2016. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital antes del inicio de la investigación y se obtuvo consentimiento por escrito de todas las pacientes.

Se comparó las concentraciones plasmáticas de ANG-2 durante el segundo trimestre de las embarazadas que desarrollaron preeclampsia y aquellas que no. Se excluyó a las embarazadas con polihidramnios, hemorragia del tercer trimestre (desprendimiento prematuro de placenta, placenta previa), sospecha de restricción del crecimiento intrauterino del feto (circunferencia cefálica, circunferencia abdominal y longitud del fémur menor del percentil 10 de referencia, con confirmación posnatal de peso menor al percentil 10 de referencia), síndrome de HELLP, alteraciones de la frecuencia cardíaca fetal, gestaciones múltiples, presencia de infección intrauterina o materna activa, enfermedad hipertensiva crónica (hipertensión antes de las 20 semanas de embarazo), enfermedad cardíaca, hematológica, hepática, renal o sistémica crónica, diabetes mellitus pre o gestacional, hábito tabáquico, aquellas embarazadas en las cuales no se pudo obtener muestras de sangre y en las que se hubiera utilizado medicamentos que alteraran la concentración plasmática de ANG-2. También se excluyó a las pacientes que se negaron a participar en la investigación.

La preeclampsia se definió como la presión arterial sistólica de 140 mmHg o más, o presión arterial diastólica de 90 mmHg o más, confirmada por 6 h o más de diferencia, mientras que la proteinuria se definió como 300 mg o más de proteína en una muestra de 24 h, o 1 a 2 cruces de proteinuria en un examen cualitativo después de las 20 semanas de gestación⁽¹⁰⁾. La presión sanguínea se midió en posición sentada después de 15 min de descanso, usando un esfigmógrafo de



mercurio estándar con un manguito de 14 cm. La presión arterial sistólica y diastólica (tomada en relación con el quinto ruido de Korotkoff) se ubicó con relación al punto de 2 mmHg más cercano. El método palpatorio se utilizó para verificar las lecturas auscultatorias de la presión arterial sistólica. Las presiones arteriales sistólica y diastólica se calcularon del promedio de la presión arterial de cada brazo.

Una vez seleccionadas las pacientes para el estudio, se llenó una ficha de recolección de datos que incluyó: identificación de la paciente, antecedentes personales y gineco-obstétricos, control prenatal, edad de gestación (por fecha de última regla o ecografía del primer trimestre) y concentraciones plasmáticas de ANG-2. La edad gestacional se calculó sobre la fecha de la última menstruación y se corrigió por ultrasonido si las mediciones durante el primer trimestre mostraban una diferencia de más de 7 días. Las muestras de ANG-2 fueron tomadas entre las 17 y 20 semanas de embarazo para determinar las concentraciones plasmáticas de ANG-2. Todos los embarazos fueron seguidos hasta el parto, y se los catalogó de acuerdo al desarrollo de preeclampsia (casos; grupo A) o no (controles; grupo B).

Se recolectó las muestras de sangre de la vena antecubital en el momento de la realización de la evaluación ecográfica de rutina, en todas las embarazadas seleccionadas, durante el segundo trimestre del embarazo (17 a 20 semanas). Se dejó coagular todas las muestras a temperatura ambiente en un tubo con litio / heparina y se las almacenó a -80°C hasta el momento de procesarlas. Posteriormente, fueron centrifugadas a 1 500 rpm por 10 minutos luego de 30 minutos de la toma la muestra y almacenadas posteriormente a -80°C . La determinación de las concentraciones de ANG-2 fue realizada utilizando una prueba de ELISA (R&D Systems, Inc., USA). Todas las mediciones fueron hechas por duplicado y el promedio fue utilizado como resultado final. La sensibilidad fue de 0,06 ng/mL. El coeficiente de variación intra e interensayo fue de 9% y 12%, respectivamente.

Los valores obtenidos fueron presentados como promedio \pm desviación estándar. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la distribución normal de los datos ($p > 0,05$). La prueba t de student para muestras

no relacionadas se utilizó para el análisis de los grupos y para comparar las variables continuas. La precisión de las determinaciones ANG-2 para la predicción del desarrollo de preeclampsia es presentada en función de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. Se utilizó el análisis operador-receptor para determinar el mejor valor de corte. Se consideró $p < 0,05$ como estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Se obtuvo los resultados de las mediciones de 504 pacientes, de las cuales 41 embarazadas (8,1%) desarrollaron preeclampsia (grupo A) y 463 embarazadas (91,9%) fueron consideradas como controles (grupo B). Las características generales de los 2 grupos de embarazadas se muestran en la tabla 1. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la edad materna, edad gestacional y presión arterial sistólica y diastólica al momento de la realización de la ecografía ($p = \text{ns}$). La edad gestacional al momento del diagnóstico de preeclampsia en el grupo A fue $35,0 \pm 3,2$ semanas. Se observó diferencias estadísticamente significativas en la edad gestacional al momento del parto, presión arterial sistólica y diastólica al momento del parto, proteinuria en 24 h y peso del recién nacido al nacer entre los 2 grupos de embarazadas ($< 0,0001$).

En la figura 1 se muestra los valores de las mediciones biométricas fetales y las concentraciones de ANG-2. Se observó diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de ANG-2 entre las pacientes del grupo A ($26,0 \pm 4,7$ ng/mL) y las pacientes del grupo B ($19,7 \pm 5,9$ ng/mL; $p < 0,0001$).

En la figura 2 se muestra la curva operador-receptor para la precisión de las concentraciones de ANG-2 en la predicción de la preeclampsia. Un valor de corte de 22 ng/mL milímetros presentó un valor bajo la curva de 0,77 (intervalo de confianza de 95% [IC 95%]; 0,71 a 0,83) y tuvo sensibilidad de 75,6% (IC 95%; 59,7 a 67,6), especificidad 58,5% (IC 95%; 53,9 a 63,0), valor predictivo positivo 14,2% (IC 95%; 9,9 a 19,7) y valor predictivo negativo 96,5% (IC 95%; 93,6 a 98,3). La razón de posibilidad positiva fue 1,8 (IC 95%; 1,4 a 2,1) y la exactitud pronóstica fue 61,1%.



TABLA I. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS GESTANTES.

	Grupo A Casos (n = 41)	Grupo B Controles (n = 463)	p
Edad materna, años	22,9 +/- 2,5	22,6 +/- 2,2	ns
Índice de masa corporal, kg/m ²	28,6 +/- 4,5	27,2 +/- 4,4	ns
Edad gestacional al momento del examen, semanas	18,3 +/- 0,9	18,5 +/- 0,8	ns
Presión arterial sistólica al momento del examen, mmHg	110,5 +/- 5,3	111,7 +/- 5,1	ns
Presión arterial diastólica al momento del examen, mmHg	77,5 +/- 4,2	77,2 +/- 3,8	ns
Edad gestacional al momento del parto, semanas	35,0 +/- 3,2	38,4 +/- 1,4	< 0,001
Presión arterial sistólica al momento del parto, mmHg	139,9 +/- 14,4	115,8 +/- 7,1	< 0,001
Presión arterial diastólica al momento del parto, mmHg	98,6 +/- 5,7	74,1 +/- 7,8	< 0,001
Proteinuria, g/24 horas	4,30 +/- 1,60	0,24 +/- 0,03	< 0,001
Peso del recién nacido al nacer, gramos	2757 +/- 900	3595 +/- 350	< 0,001

FIGURA 1. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE ANGIOPOYETINA-2 EN EL SEGUNDO TRIMESTRE EN EMBARAZADAS QUE POSTERIORMENTE DESARROLLARON PREECLAMPSIA COMPARADO CON LAS EMBARAZADAS CONTROLES SANAS.

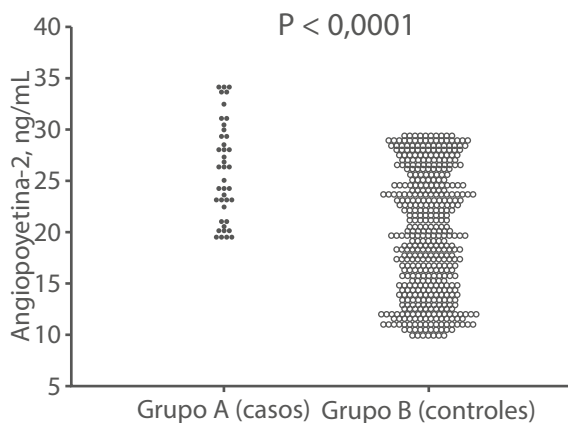
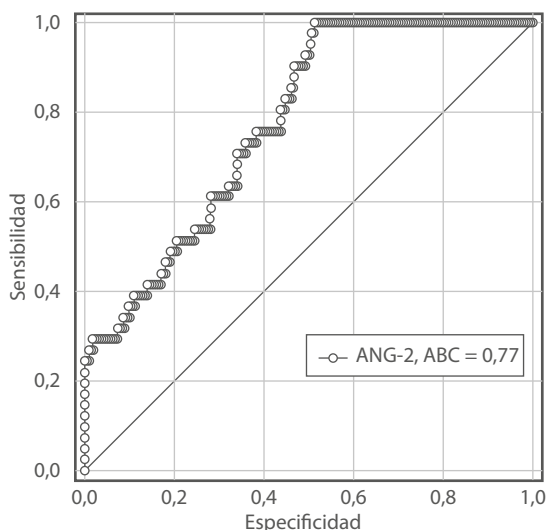


FIGURA 2. CURVA OPERADOR-RECEPTOR DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE ANGIOPOYETINA-2 EN LA PREDICCIÓN DE PREECLAMPSIA.



DISCUSIÓN

Durante las últimas dos décadas, se han analizado varios marcadores biofísicos y bioquímicos como predictores de preeclampsia. Los factores involucrados en el balance angiogénico han sido sugeridos como marcadores potenciales. Las angiopoyetinas tienen el potencial de ser uno de estos marcadores para el desarrollo de preeclampsia debido a su gran importancia durante la implantación y desarrollo placentario. Los resultados de la presente investigación aportan evidencia de un aumento de las concentraciones de ANG-2 en el segundo trimestre en embarazadas que posteriormente desarrollaron preeclampsia y que esta tiene una importante capacidad de discriminar entre las embarazadas que desarrollan preeclampsia y las que no.

Aunque la causa de la preeclampsia es aún desconocida, se conoce que el origen de esta condición es la placenta. Se han analizado varias sustancias para evaluar si permiten predecir la aparición del síndrome⁽¹¹⁾. Las angiopoyetinas son parte integral de la vasculogénesis y angiogénesis. Este proceso de neovascularización es iniciado por factores angiogénicos, que representan un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de la placenta⁽¹²⁾.

La ANG-2 es un inhibidor de la ANG-1 / Tie2, y altera la interacción entre las células endoteliales y los pericitos. Los capilares fetales que se ubican inmediatamente por debajo de las células trofoblásticas pueden ser las células blanco de



la ANG-2 producida por el trofoblasto. Sin embargo, para que esto ocurra, la ANG-2 tendría que pasar hacia la capa de sinciotrofoblasto subyacente. Esto es posible con otras sustancias como la gonadotropina coriónica, producida por el sinciotrofoblasto, que se encuentra en la circulación fetal⁽¹³⁾.

En la placenta, el ARNm y la proteína de la ANG-2 son expresados en grandes cantidades en el primer trimestre, siendo la placenta probablemente la principal fuente, pero la expresión disminuye marcadamente hacia el término del embarazo^(4,14). Existe una marcada angiogénesis en el embarazo temprano caracterizada por el crecimiento de las ramas vasculares. El control del crecimiento y la extensión de las ramificaciones vasculares probablemente dependen de la interacción entre los factores locales, que incluyen ANG-1, ANG-2, VEGF y la cinasa de tirosina soluble similar al FMS (sFLT-1), producidos por la placenta⁽⁵⁾.

Este balance puede ser alterado por condiciones patológicas⁽²⁾, ya que en el tercer trimestre la expresión de ANG-2 placentaria disminuye en embarazadas con preeclampsia establecida⁽¹⁴⁾. También, las concentraciones circulantes disminuyen tanto en la preeclampsia como en la hipertensión inducida por el embarazo^(8,15,16). Hiroshi y col^(8,15) estudiaron las concentraciones plasmáticas de ANG-2 y la relación sFLT-1 / ANG-2 en embarazadas con preeclampsia. Concluyeron que las concentraciones de ANG-2 eran significativamente más bajas en las embarazadas con preeclampsia^(8,15) y la relación está incrementada en embarazadas con signos clínicos de preeclampsia comparadas con controles sanos⁽¹⁵⁾. Estos datos señalan que el desarrollo de la disfunción vascular placentaria y la función vascular materna está asociado con un exceso de los factores antiangiogénicos en el desarrollo de la preeclampsia. Ambos estudios tomaron las muestras de sangre al inicio de los síntomas y, por lo tanto, es difícil comparar los resultados con los hallazgos de la presente investigación.

Al igual que en el presente estudio, Leinonen y col⁽¹⁷⁾ encontraron un aumento de las concentraciones de ANG-2 entre las 16 y 20 semanas en embarazadas que posteriormente desarrollaron preeclampsia. La posible explicación para este evento paradójico observado en la presente investigación (aumento de las concen-

traciones de ANG-2 en el segundo trimestre) puede ser explicada por el aumento de las concentraciones del VEGF en las preeclámpticas⁽¹⁸⁾. Este factor induce la separación del receptor Tie-2 de la superficie celular a la circulación. El Tie-2 circulante, a su vez, se une a la ANG-2 circulante, el cual se considera que es un mecanismo regulador de su acción⁽¹⁹⁾. Por lo que por esta vía las preeclámpticas con manifestaciones clínicas pueden disminuir en las concentraciones circulantes de ANG-2, aun cuando estas concentraciones no están disminuidas antes de la enfermedad.

Los mecanismos detrás del incremento de las concentraciones de ANG-2 antes de la aparición de la preeclampsia aún son desconocidos. Los hallazgos de esta investigación son similares a observaciones previas que describen aumentos en las concentraciones de factores antiangiogénicos antes del desarrollo de la preeclampsia^(20,21). En embarazos complicados con preeclampsia, generalmente se ha considerado que la placenta está bajo condiciones de hipoxia. Esto se considera así por los resultados de la disminución del aporte de sangre materna, la cual es secundaria a la conversión incompleta de las arterias espirales endometriales por la migración del trofoblasto extraveloso, que no logra invadir los segmentos endometriales de estas arterias⁽²²⁾. Esto puede llevar a una marcada desviación (a favor de la ANG-2) cuando las vellosidades terminales son sometidas a condiciones de hipoxia.

Se ha demostrado que la hipoxia aumenta la expresión del ARNm de la ANG-2 y del VEGF, pero no de la ANG-1 o del TIE 2^(14,23). Existen dos posibles razones para esto. Primero, la tensión de oxígeno en el espacio intervelloso durante el primer y segundo trimestre del embarazo es más baja en comparación con el tercer trimestre⁽²⁴⁾. Por lo tanto, las células podrían responder en forma diferencial a la tensión de oxígeno en cada uno de los trimestres. Es conocido que las concentraciones de enzimas antioxidantes en las vellosidades se incrementan con el progreso del embarazo y, por lo tanto, el oxígeno produce la muerte de sinciotrofoblasto en el primer trimestre⁽²⁵⁾. Segundo, estas variaciones también son dependientes de las diferencias en la extensión y madurez de los vasos sanguíneos en el árbol veloso durante las diferentes fases del embarazo. La proporción de los vasos asociados



a pericitos en las vellosidades es mayor al término del embarazo que en el primer y segundo trimestre⁽⁹⁾.

Los datos de la investigación confirman los hallazgos de investigaciones previas y demuestran una alta sensibilidad y valor predictivo negativo de esta prueba, lo cual significa que las embarazadas con valores de ANG-2 superiores a 22 ng/mL tienen un factor indicador de riesgo para el desarrollo de preeclampsia. De acuerdo con los resultados, los referidos valores tienen un valor predictivo positivo de 53% y debería incrementar la sospecha clínica de desarrollo de preeclampsia, lo cual debe ser confirmado con pruebas adicionales y estudios a gran escala.

Los hallazgos de la presente investigación permiten concluir que las concentraciones de angiopoietina-2 en el segundo trimestre del embarazo pueden predecir el desarrollo de preeclampsia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hod T, Cerdeira AS, Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(10). pii: a023473. doi: 10.1101/cshperspect.a023473.
2. Fisher SJ. Why is placentation abnormal in preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213(4 Suppl):S115-22. doi: 10.1016/j.ajog.2015.08.042.
3. Guzin K, Tomruk S, Tuncay YA, Naki M, Sezginsoy S, Zemheri E, et al. The relation of increased uterine artery blood flow resistance and impaired trophoblast invasion in pre-eclamptic pregnancies. *Arch Gynecol Obstet.* 2005;272(4):283-8.
4. Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A, Jaffe RB. Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(9):4213-24.
5. Wulff C, Wilson H, Dickson SE, Wiegand SJ, Fraser HM. Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod.* 2002;66(3):802-12.
6. Sewduth R, Santoro MM. "Decoding" angiogenesis: new facets controlling endothelial cell behavior. *Front Physiol.* 2016;7:306. doi: 10.3389/fphys.2016.00306.
7. Noori M, Donald AE, Angelakopoulou A, Hingorani AD, Williams DJ. Prospective study of placental angiogenic factors and maternal vascular function before and after preeclampsia and gestational hypertension. *Circulation.* 2010;122(5):478-87. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.895458.
8. Hirokoshi K, Maeshima Y, Kobayashi K, Matsuura E, Sugiyama H, Yamasaki Y, et al. Increase of serum angiopoietin-2 during pregnancy is suppressed in women with preeclampsia. *Am J Hypertens.* 2005;18(9 Pt 1):1181-8.
9. Wang LJ, Chen WP, Peng W, Xu L, Sui AH, Ye YH. Correlation of angiopoietin-2 and angiopoietin-2 receptor expressions in serum and placenta with preeclampsia. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2011;46(3):167-71.
10. Poston L. Prediction and diagnosis of pre-eclampsia; the scientific basis. *Pregnancy Hypertens.* 2013;3(2):57. doi: 10.1016/j.preghy.2013.04.002.
11. Polsani S, Phipps E, Jim B. Emerging new biomarkers of preeclampsia. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2013;20(3):271-9. doi: 10.1053/j.ackd.2013.01.001.
12. Seval Y, Sati L, Celik-Ozenci C, Taskin O, Demir R. The distribution of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and their receptors tie-1 and tie-2 in the very early human placenta. *Placenta.* 2008;29(9):809-15. doi: 10.1016/j.placenta.2008.06.009.
13. Moffett A, Hiby SE. How does the maternal immune system contribute to the development of pre-eclampsia? *Placenta.* 2007;28 Suppl A:S51-6.
14. Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussoleti B, et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. *Am J Pathol.* 2000;156(6):2185-99.
15. Hirokoshi K, Maeshima Y, Kobayashi K, Matsuura E, Sugiyama H, Yamasaki Y, et al. Elevated serum sFlt-1/Ang-2 ratio in women with preeclampsia. *Nephron Clin Pract.* 2007;106(1):c43-50.
16. Karakus S, Bozoklu Akkar O, Yildiz C, Sancakdar E, Cetin M, Cetin A. Serum levels of ET-1, M30, and angiopoietins-1 and -2 in HELLP syndrome and preeclampsia compared to controls. *Arch Gynecol Obstet.* 2016;293(2):351-9.
17. Leinonen E, Wathén KA, Alfthan H, Ylikorkala O, Andersson S, Stenman UH, et al. Maternal serum angiopoietin-1 and -2 and tie-2 in early pregnancy ending in preeclampsia or intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(1):126-33. doi: 10.1210/jc.2009-0715.
18. Wikström AK, Larsson A, Eriksson UJ, Nash P, Nordén-Lindeberg S, Olovsson M. Placental growth factor and soluble FMS-like tyrosine kinase-1 in early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2007;109(6):1368-74.
19. Onimaru M, Yonemitsu Y, Suzuki H, Fujii T, Sueishi K. An autocrine linkage between matrix metalloproteinase-14 and Tie-2 via ectodomain shedding modulates angiopoietin-1-dependent function in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(4):818-26. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.201111.
20. Romero R, Nien JK, Espinoza J, Todem D, Fu W, Chung H, et al. A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008;21(1):9-23. doi: 10.1080/14767050701830480.
21. Govender N, Naicker T, Rajakumar A, Moodley J. Soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endoglin



- in HIV-associated preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;170(1):100-5. doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.05.021.
22. Kadyrov M, Kingdom JC, Huppertz B. Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194(2):557-63.
 23. Park YS, Kim NH, Jo I. Hypoxia and vascular endothelial growth factor acutely up-regulate angiopoietin-1 and Tie2 mRNA in bovine retinal pericytes. *Microvasc Res.* 2003;65(2):125-31.
 24. Frenco JL, Thérond P, Guibourdenche J, Bidart JM, Vidaud M, Evain-Brion D. Modulation of copper/zinc superoxide dismutase expression and activity with in vitro differentiation of human villous cytotrophoblasts. *Placenta.* 2000;21(8):773-81.
 25. James JL, Stone PR, Chamley LW. The effects of oxygen concentration and gestational age on extravillous trophoblast outgrowth in a human first trimester villous explant model. *Hum Reprod.* 2006;21(10):2699-705.