

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Farmácia

Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

Júlia Zanon Pereira

**DESENVOLVIMENTO DE *ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY* (ELISA)
PARA DETERMINAÇÃO PLASMÁTICA DE FATOR DE CRESCIMENTO
PLACENTÁRIO (PIGF) EM GESTANTES COM ALTO RISCO DE DESENVOLVER
PRÉ-ECLÂMPsia**

Belo Horizonte

2024

Júlia Zanon Pereira

**DESENVOLVIMENTO DE *ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY* (ELISA)
PARA DETERMINAÇÃO PLASMÁTICA DE FATOR DE CRESCIMENTO
PLACENTÁRIO (PIGF) EM GESTANTES COM ALTO RISCO DE DESENVOLVER
PRÉ-ECLÂMPSIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lara Carvalho Godoi

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Nessralla Alpoim

Belo Horizonte

2024

P436d Pereira, Júlia Zanon.
Desenvolvimento de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) para determinação plasmática de fator de crescimento placentário (PIGF) em gestantes com alto risco de desenvolver pré-eclâmpsia [recurso eletrônico] / Júlia Zanon Pereira. – 2024.
1 recurso eletrônico (107 f. : il.) : pdf

Orientadora: Lara Carvalho Godoi.
Coorientadora: Patrícia Nessralla Alpoim.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Pré-eclâmpsia – Teses. 2. Gravidez – complicações – Teses. 3. Indutores da angiogênese – Teses. 4. Fator de crescimento placentário – Teses. 5. Ensaio de imunoadsorção enzimática – Teses. I. Godoi, Lara Carvalho. II. Alpoim, Patrícia Nessralla. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:618.3



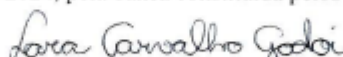
FOLHA DE APROVAÇÃO

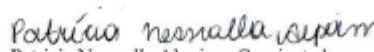
**DESENVOLVIMENTO DE ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)
PARA DETERMINAÇÃO PLASMÁTICA DE FATOR DE CRESCIMENTO
PLACENTÁRIO (PIGF) EM GESTANTES COM ALTO RISCO DE DESENVOLVER
PRÉ-ECLÂMPSIA**

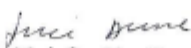
JÚLIA ZANON PEREIRA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 21 de março de 2024, pela banca constituída pelos membros:


Profa. Lara Carvalho Godoi - Orientadora
UFMG


Profa. Patricia Nessralla Alpoim - Coorientadora
UFMG


Profa. Luci Maria Sant'Ana Dusse
UFMG


Prof. Leonardo Rezende Junior
Ampligenix

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar a minha gratidão a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a construção desse trabalho, em especial:

A Deus e aos bons guias espirituais que nunca me abandonaram e me auxiliaram a ser resiliente.

À minha família, em especial meus pais, minha irmã e minhas tias Eunice e Maria das Graças, pela confiança, apoio e amor que sempre demonstraram a mim.

Aos meus amigos e meu namorado Glauber, pelo companheirismo, afeto e por nunca deixarem eu me sentir só.

À minha orientadora Lara Carvalho e à minha coorientadora Patrícia Nessralla, pela oportunidade, pelos ensinamentos e por terem sido sempre solícitas.

Aos alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado da minha equipe pelo auxílio e dedicação que foram primordiais para que esta pesquisa fosse concluída.

Às pacientes que doaram voluntariamente suas amostras, sem elas a realização deste trabalho não seria possível.

À equipe da Maternidade Odete Valadares, principalmente à Kelly, que me auxiliou em todas as demandas que tive dentro do hospital.

À todos aqueles que fizeram parte da minha trajetória acadêmica, principalmente aos professores que me enriqueceram com conhecimento teórico e prático.

“O aprendizado é o significado mais límpido da vida, pois jamais se termina uma existência sem que se aprenda algo.”

Maria Clara Fraga Lopes

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) caracteriza-se pelo surgimento de hipertensão após a 20^a semana de gestação associada à disfunção órgão alvo materna e/ou comprometimento uteroplacentário. Essa doença pode gerar complicações graves que prejudicam a saúde materna e do bebê, sendo a doença hipertensiva com maior obituário perinatal. A etiologia da PE ainda é pouco esclarecida. Acredita-se que diversos processos patogênicos estão envolvidos e se sobrepõem, sendo o estresse do sinciciotrofoblasto o principal, levando à ativação de vias metabólicas que resultam em desequilíbrio angiogênico, lesão endotelial, estresse oxidativo e quadro inflamatório, resultando nos sinais e sintomas da PE. Cabe ressaltar que o desequilíbrio entre o fator de crescimento placentário (PlGF), de ação pró-angiogênica e com concentração plasmática reduzida no contexto da PE, e o receptor tirosina quinase do tipo FMS solúvel (sFlt-1), de ação anti-angiogênica e com concentração plasmática aumentada em gestantes com a doença, contribui consideravelmente para a disfunção endotelial. Diversos estudos têm demonstrado que o uso clínico da razão sFlt-1/PlGF tem potencial preditivo e no diagnóstico precoce da PE, permitindo intervenções clínicas que previnam maiores complicações maternas e fetais. O Brasil não detém domínio a tecnologia necessária para produzir e comercializar os produtos utilizados na obtenção da razão sFlt-1/PlGF e depende da importação de *kits* de alto valor agregado, o que os torna pouco acessíveis para uso clínico. Portanto, objetivou-se o desenvolvimento de um conjunto diagnóstico ELISA para determinação plasmática de PlGF em gestante com alto risco de desenvolver PE, uma proposta inédita no Brasil que visa contribuir para a redução dos custos e aumentar a aplicação clínica da razão sFlt-1/PlGF. Diversos ensaios foram realizados no intuito de definir os parâmetros a serem aplicados no sistema diagnóstico: concentração do anticorpo de captura (4µg/mL), do anticorpo ligado à biotina (60ng/mL) e da estreptavidina-peroxidase (diluição 1:200), diluição da amostra (não diluída), condições de incubação (45 minutos à 37°C), ciclos de lavagem (3 ciclos), formulações das soluções e estabilidade dos reagentes (a maioria estáveis para serem armazenados por 1,09 anos à 5°C). Um sistema imunométrico, capaz de determinar a concentração de PlGF na faixa de 34 a 2186pg/mL foi obtido ao final deste projeto.

Palavras-chaves: Pré-eclâmpsia; Fatores Angiogênicos; Razão sFlt-1/PlGF; ELISA.

ABSTRACT

Pre-eclampsia (PE) is characterized by the onset of hypertension after the 20th week of gestation associated with maternal target organ dysfunction and/or uteroplacental compromise. This condition can lead to serious complications that affect both maternal and fetal health, being the hypertensive disorder with the highest perinatal mortality. The etiology of PE is still poorly understood. It is believed that several pathogenic processes are involved and overlap, with syncytiotrophoblast stress being the main one, leading to the activation of metabolic pathways resulting in angiogenic imbalance, endothelial injury, oxidative stress, and an inflammatory state, resulting in the signs and symptoms of PE. It is worth noting that the imbalance between placental growth factor (PlGF), which has pro-angiogenic action and reduced plasma concentration in the context of PE, and soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1), which has anti-angiogenic action and increased plasma concentration in pregnant women with the disease, contributes considerably to endothelial dysfunction. Several studies have shown that the clinical use of the sFlt-1/PlGF ratio has predictive potential and in the early diagnosis of PE, allowing clinical interventions to prevent major maternal and fetal complications. Brazil lacks the technology necessary to produce and market the products used in obtaining the sFlt-1/PlGF ratio and depends on the importation of high-value kits, which makes them inaccessible for clinical use. Therefore, the objective was to develop an ELISA diagnostic kit for plasma determination of PlGF in pregnant women at high risk of developing PE, a novel proposal in Brazil aimed at reducing costs and increasing the clinical application of the sFlt-1/PlGF ratio. Several assays were performed to define the parameters to be applied in the diagnostic system: capture antibody concentration (4 μ g/mL), biotin-conjugated antibody concentration (60ng/mL), streptavidin-peroxidase dilution (1:200), sample dilution (undiluted), incubation conditions (45 minutes at 37°C), washing cycles (3 cycles), solution formulations, and reagent stability (most stable for storage for 1.09 years at 5°C). An immunoassay system, capable of determining PlGF concentration in the range of 34 to 2186pg/mL, was obtained at the end of this project.

Keywords: Pre-eclampsia; Angiogenic Factors; sFlt-1/PlGF Ratio; ELISA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da remodelação das artérias uterinas espiraladas.....	17
Figura 2 - Atuação dos fatores angiogênicos na fisiopatologia da PE.....	21
Fígura 3 - Modelo paramétrico contínuo do intervalo de referência do PlGF (pg/mL) em grávidas de risco habitual mostrando o 5º percentil em função da idade gestacional (semanas)..	23
Figura 4 - Esquema simplificado dos principais tipos de ELISA.....	31
Figura 5 - Fluxograma seleção ECLIPSE.....	35
Figura 6 - Representação esquemática dos principais componentes do ELISA PlGF.....	36
Figura 7 - Representação esquemática da sensibilização da placa de ELISA PlGF.....	37
Figura 8 - Adição da amostra na placa.....	38
Figura 9 - Representação esquemática da adição do anticorpo ligado à biotina.....	39
Figura 10 - Representação esquemática da adição de estreptavidina-HRP no ELISA PlGF.....	40
Figura 11 - Representação esquemática da adição do substrato à placa.....	41
Figura 12 - Mudança de coloração de azul para amarelo após a adição de solução de parada em um ELISA.....	41
Figura 13 – Protocolo final do conjunto diagnóstico ELISA PlGF.....	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Absorbâncias obtidas para o <i>Pool 1</i> em diferentes concentrações do anticorpo de captura.....	42
Gráfico 2 - Absorbâncias obtidas para o <i>Pool 1</i> e Amostra 1 em diferentes concentrações do anticorpo ligado à biotina.....	43
Gráfico 3 - Absorbância das amostras em diferentes diluições de estreptavidina-peroxidase.....	43
Gráfico 4 - Absorbâncias obtidas para diferentes diluições do <i>Pool 1</i>	44
Gráfico 5 - Absorbâncias das amostras sem diluir e diluída 1:2.....	45
Gráfico 6 - Sensibilização usando tampão fosfato versus tampão carbonato.....	45
Gráfico 7 - Incubações 2h/21°C versus 1h/37°C.....	46
Gráfico 8 - Bloqueio clássico versus Bloqueio estabilizador.....	47
Gráfico 9 - Impacto do número de ciclos de lavagens no <i>background</i> do teste.....	48
Gráfico 10 - Absorbâncias obtidas em diferentes tempos de incubação das amostras.....	49
Gráfico 11 - Absorbâncias obtidas para a incubação separada versus incubação conjunta da amostra e anticorpo ligado à biotina.....	50
Gráfico 12 - Absorbâncias obtidas para incubação separada versus incubação conjunta do anticorpo ligado à biotina.....	51
Gráfico 13 - Absorbâncias obtidas no teste de estabilidade da fase sólida do ELISA.....	52
Gráfico 14 - Absorbâncias obtidas no teste de estabilidade do anticorpo ligado à biotina.....	53
Gráfico 15 - Curva de calibração proposta para o ensaio.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Produtos aprovados pela ANVISA para a determinação plasmática de sFlt-1.....	27
Quadro 2 - Produtos aprovados pela ANVISA para a determinação plasmática de PlGF.....	27
Quadro 3 - Critérios de inclusão de pacientes no projeto ECLIPSE.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Absorbâncias obtidas no teste de estabilidade da fase sólida.....	52
Tabela 2 - Descrição detalhada das absorbâncias obtidas e sua variação ao longo dos dias de teste da estabilidade do anticorpo ligado à biotina.....	53
Tabela 3 - Descrição detalhada das absorbâncias obtidas no teste da estabilidade da Solução A.....	54
Tabela 4 - Descrição detalhada das absorbâncias obtidas no teste de estabilidade da Solução B.....	55
Tabela 5 - Descrição detalhada das absorbâncias obtidas no teste de estabilidade da Solução C.....	55
Tabela 6 - Descrição detalhada das absorbâncias obtidas no teste de estabilidade da Solução D.....	55
Tabela 7 - Descrição detalhada das absorbâncias obtidas no teste de estabilidade da Solução E.....	55
Tabela 8 - Diluições, concentrações e absorbâncias obtidas nos pontos da curva padrão.....	56
Tabela 9 - Diluições, concentrações e absorbâncias obtidas nos pontos da curva padrão após as alterações do protocolo.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PE	Pré-Eclâmpsia
ACOG	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
PlGF	<i>Placental Growth Factor</i>
sFlt-1	<i>Soluble fms-like tyrosine kinase-1</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
SHG	Síndromes Hipertensivas da Gravidez
ISSHP	<i>International Society for the study of Hipertension in Pregnancy</i>
CIUR	Crescimento Intrauterino Restrito
OMS	Organização Mundial de Saúde
WHO	<i>World Health Organization</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
AT1-R	<i>Angiotensin II Type I Receptor</i>
AT1-AA	<i>Agonist AutoAntibodies to the Angiotensin II Type I Receptor</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR1	Receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular
Flt-1	<i>Fms-like tyrosine kinase-1</i>
KDR	<i>Kinase insert Domain Receptor</i>
HIF	<i>Hypoxia-Inducible Factor</i>
RBEHG	Rede Brasileira de Estudos sobre a Hipertensão na Gravidez
NICE	<i>National Institute for Health and Care Excellence</i>
VPP	Valor Preditivo Positivo
VPN	Valor Preditivo Negativo

UTI	Unidade de Terapia Intensiva
ANS	Agência Nacional de Saúde
SBPC	Sociedade Brasileira de Patologia Clínica
FEBRASGO	Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia
SUS	Sistema Único de Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
EIA	Ensaio imunoenzimático
pH	Potencial Hidrogênionico
COEP-MG	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais
ECLIPSE	Estudo de Coleta Longitudinal para Investigação de Pré-eclâmpsia
PNAR	Pré-natal de Alto Risco
MOV	Maternidade Odete Valadares
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
VPM	Variação Percentual Média

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Pré-eclâmpsia (PE)	16
2.2 Fisiopatologia da pré-eclâmpsia	18
2.2.1 <i>Isquemia uteroplacentária</i>	<i>18</i>
2.2.2 <i>Estresse oxidativo, disfunção endotelial e inflamação</i>	<i>20</i>
2.3 Fatores angiogênicos relacionados à pré-eclâmpsia	22
2.3.1 <i>Fator de crescimento placentário (PlGF)</i>	<i>23</i>
2.3.2 <i>Tirosina quinase do tipo FMS solúvel (sFlt-1)</i>	<i>25</i>
2.4 Predição de pré-eclâmpsia	26
2.4.1 <i>Uso da razão sFlt-1/ PlGF</i>	<i>27</i>
2.5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	30
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4 METODOLOGIA E RESULTADOS.....	35
4.1 Amostras biológicas.....	35
4.2 Estudo de Coleta Longitudinal para Investigação de Pré-eclâmpsia (ECLIPSE)	35
4.3 Desenvolvimento e caracterização do Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).	38
4.3.1 <i>Etapas da metodologia ELISA</i>	<i>38</i>
4.3.1.1 <i>Sensibilização da placa</i>	<i>38</i>
4.3.1.2 <i>Lavagem</i>	<i>39</i>
4.3.1.3 <i>Bloqueio.....</i>	<i>39</i>
4.3.1.4 <i>Adição da amostra.....</i>	<i>40</i>
4.3.1.5 <i>Lavagem</i>	<i>40</i>
4.3.1.6 <i>Adição do anticorpo ligado à biotina</i>	<i>40</i>
4.3.1.7 <i>Lavagem</i>	<i>41</i>
4.3.1.8 <i>Adição de estreptavidina-peroxidase</i>	<i>41</i>
4.3.1.9 <i>Lavagem</i>	<i>42</i>
4.3.1.10 <i>Adição do substrato</i>	<i>42</i>
4.3.1.11 <i>Adição da solução de parada</i>	<i>43</i>

4.3.2 Testes de avaliação do desempenho	44
4.3.2.1 Titulação do anticorpo de captura.....	44
4.3.2.2 Titulação do anticorpo ligado à biotina	44
4.3.2.3 Titulação da estreptavidina-peroxidase.....	45
4.3.2.4 Diluição da amostra	46
4.3.2.5 Comparação do uso da amostra sem diluir versus diluída 1:2	46
4.3.2.6 Sensibilização com tampão fosfato versus tampão carbonato	47
4.3.2.7 Avaliação das condições de tempo e temperatura de incubação da amostra, anticorpo ligado à biotina e estreptavidina-peroxidase.....	48
4.3.2.8 Solução de bloqueio	49
4.3.2.9 Ciclos de lavagens	50
4.3.2.10 Redução do tempo de incubação das amostras.....	51
4.3.2.11 Incubação conjunta da amostra e anticorpo ligado à biotina.....	52
4.3.2.12 Incubação conjunta do anticorpo ligado à biotina e estreptavidina-HRP ..	53
4.3.2.13 Estabilidade da fase sólida.....	54
4.3.2.14 Estabilidade do anticorpo ligado à biotina.....	55
4.3.2.15 Estabilidade da solução estreptavidina-HRP.....	57
4.3.2.16 Curva de calibração	59
4.3.2.17 Alterações nos parâmetros e soluções do conjunto diagnóstico	60
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÃO.....	69
7 PERSPECTIVAS.....	70
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
APÊNDICE A	83
APÊNDICE B.....	89
APÊNDICE C	98
APÊNDICE D	102
APÊNDICE E	103

1. INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia (PE) é um distúrbio específico da gravidez e, anteriormente, para que o diagnóstico fosse estabelecido era necessária a presença de hipertensão associada à proteinúria (DAVEY; MACGILLIVRAY, 1988). A partir de 2013, a proteinúria deixou de ser mandatória no diagnóstico, sendo a definição de PE alterada pelo Colégio Americano de Ginecologia e Obstetrícia (ACOG) e consentida pela comunidade científica para: surgimento de quadro hipertensivo após a 20ª semana de gestação associada à proteinúria e/ou a lesão de órgão-alvo, como aumento da atividade das transaminases hepáticas ou trombocitopenia (ACOG, 2013). A alteração nos critérios diagnósticos da PE ocorreu em decorrência de evidências encontradas em autópsias e relatórios clínicos que explicitam que a PE e a eclâmpsia são doenças multissistêmicas (HETCH *et al.*, 2017).

A PE pode gerar complicações graves que prejudicam a saúde materna e do bebê, sendo a principal causa de óbito materno e fetal. Além disso, aumenta o risco cardiovascular e de desenvolvimento de síndromes metabólicas à longo prazo nas mulheres (KAHHALE; FRANCISCO; ZUGAIB, 2018; MA'AYEH; CONSTANTINE, 2020). Acredita-se que a etiologia da doença está relacionada a fatores que contribuem para o estabelecimento de quadro hipóxico uteroplacentário e resultam no estresse oxidativo do sinciciotrofoblasto, inflamação e disfunção angiogênica (ROBERTS *et al.*, 2021). O desequilíbrio entre fatores pró-angiogênicos, que estão reduzidos, e anti-angiogênicos, que estão superexpressos no contexto da doença, contribui consideravelmente para a disfunção endotelial presente na PE (RANA *et al.*, 2019).

A quantificação do fator de crescimento placentário (PlGF) de ação pró-angiogênica e do receptor tirosina quinase do tipo FMS solúvel (sFlt-1) de ação anti-angiogênica pode ser feita utilizando, por exemplo, o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (TEIXEIRA, 2011). Diversos estudos têm demonstrado que o uso clínico da razão sFlt-1/PlGF tem potencial preditivo e no auxílio ao diagnóstico precoce da PE, permitindo intervenções clínicas que previnam maiores complicações maternas e fetais (VERLOHEN *et al.*, 2021; MACDONALD *et al.*, 2022). O Brasil ainda não apresenta domínio da tecnologia para a produção de *kits* usados na determinação de sFlt-1 e PlGF e depende da importação destes, o que dificulta o amplo acesso da população, principalmente devido ao alto custo dos testes. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um conjunto diagnóstico baseado na metodologia de ELISA, para quantificação de PlGF, uma proposta inédita no Brasil que visa contribuir para a redução dos custos e auxiliar os médicos na triagem das gestantes e na tomada de decisões mais assertivas que reduzam as hospitalizações desnecessárias e os desfechos graves da doença.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Pré-eclâmpsia (PE)

As síndromes hipertensivas da gravidez (SHG) podem ser classificadas como hipertensão arterial crônica, hipertensão gestacional, pré-eclâmpsia (PE) e PE sobreposta à hipertensão arterial crônica (MOURA *et al.*, 2011). Elas representam cerca de 18% da mortalidade materna no mundo e são responsáveis por 35% dos óbitos maternos no Brasil (KHAN *et al.*, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Dentre as SHG é importante destacar a PE, visto que a doença não apresenta um bom prognóstico materno-fetal e aumenta o risco de prematuridade e de morte perinatal, em decorrência da necessidade de interrupção precoce da gravidez (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Estima-se que a incidência da PE é de aproximadamente 4,6% no mundo e 1,5% no Brasil, sendo que a presença dessa doença e suas complicações é mais comum em países em desenvolvimento, em consequência da baixa qualidade de assistência à gestante. Acredita-se ainda que os dados brasileiros sejam subestimados (ABALOS *et al.*, 2013; FEBRASGO, 2017).

Tendo em vista os impactos significativos nos indicadores relacionados à saúde materna e infantil e a elevada incidência da PE, é possível destacar que a morbidade está estritamente relacionada a complicações decorrentes da doença. Por se tratar de uma condição multissistêmica, diversos órgãos podem ser afetados, gerando impactos neurológicos, cardiorrespiratórios, hematológicos, renais, hepáticos e feto-placentários (MAGEE *et al.*, 2014). Dentre as complicações graves da PE destaca-se a eclâmpsia, caracterizada pelo surgimento de convulsões tônico-clônicas focais ou multifocais sem outra causa aparente, como epilepsia, isquemia ou hemorragia, que pode acontecer anteriormente ao parto, durante o parto ou no período pós-parto, com incidência aproximada no Brasil de 0,6% (RAMOS; SASS; COSTA, 2017). A síndrome HELLP também é uma complicação grave da PE que está associada à hemólise, elevação da atividade plasmática das enzimas hepáticas e plaquetopenia, podendo resultar em coagulopatia com necessidade de acompanhamento hemodinâmico da paciente (LEANOS-MIRANDA *et al.*, 2017; GONZÁLEZ-NAVARRO *et al.*, 2015).

Segundo a Sociedade Internacional para Estudos de Hipertensão Gestacional (ISSHP), a PE caracteriza-se pelo surgimento de hipertensão (pressão sistólica $>140\text{mmHg}$ e/ou pressão diastólica $>90\text{mmHg}$) após a 20ª semana de gestação, associada à disfunção órgão alvo materna e/ou comprometimento uteroplacentário (BROWN *et al.*, 2018; BURTON *et al.*, 2019). O diagnóstico pode ser baseado no aparecimento de sinais ou sintomas que sugerem

comprometimento multissistêmico, como cefaleia sem resposta a medicações, sintomas visuais, dor epigástrica e edema pulmonar, ou nas alterações de exames laboratoriais, como a presença de trombocitopenia (contagem de plaquetas $<100 \times 10^9/L$) ou elevação da atividade plasmática das transaminases hepáticas (valor duplicado em relação ao limite superior de referência). Ademais, as disfunções uteroplacentárias com Doppler das artérias uterinas alterado ou crescimento intrauterino restrito (CIUR) assimétrico também podem ser um critério de auxílio diagnóstico utilizado (ACOG, 2019; FEBRASGO, 2017).

O rastreamento da PE pode ser feito a partir de fatores de risco e características maternas, dentre eles os principais utilizados na triagem são: pacientes com histórico familiar ou pessoal da doença, hipertensão crônica, diabetes mellitus, obesidade, gravidez gemelar e nova paternidade (MAGEE *et al.*, 2014; FEBRASGO, 2017). Apesar da importância desses critérios para a triagem e acompanhamento minucioso do pré-natal da gestante, os fatores de risco só são capazes de rastrear cerca de 35% dos casos da doença. A maioria dos casos ocorre em grávidas nulíparas e sem fatores de risco óbvios, o que dificulta a predição da PE, sendo necessários mais estudos para o esclarecimento dos componentes genético-ambientais que influenciam no quadro clínico da doença (FERREIRA *et al.*, 2019; WILLIAMS; PIPKIN, 2011).

Atualmente, o único tratamento definitivo para PE é o parto com remoção completa da placenta, no entanto, essa prática está muito frequentemente associada ao parto prematuro. Assim, medidas preventivas devem ser adotadas para gestantes de alto risco, no intuito de evitar complicações graves, maternas e fetais (GU *et al.*, 2020). Dentre as principais recomendações estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para prevenção e tratamento da PE destaca-se o uso de ácido acetilsalicílico em baixas doses (50–150mg/dia), com suspensão antes das 36 semanas de gestação para evitar sangramento exacerbado no parto, e suplementação de cálcio (1,5-2g/dia) (WHO, 2011). Um estudo randomizado realizado por Magee *et al.* (2016) evidenciou que um bom controle pressórico com terapia anti-hipertensiva contribui para redução do índice de prematuridade, diminui os casos de trombocitopenia e a necessidade de transfusão de plaquetas. Ainda sobre o manejo clínico das gestantes com alto risco de PE, Duley *et al.* (2010) demonstrou em sua revisão sistemática que o sulfato de magnésio é um anticonvulsivante clinicamente eficaz para prevenir episódio de eclâmpsia, que consiste em uma causa significativa de morte materna em decorrência de quadro severo de hipóxia, sendo ele recomendado para pacientes com alto risco de desenvolver PE (WHO, 2011).

2.2. Fisiopatologia da pré-eclâmpsia

A etiologia da PE ainda é pouco esclarecida. Acredita-se que diversos processos estão envolvidos na patogênese da doença e se relacionam, por exemplo, com condições genéticas e fatores imunológicos maternos. Esses diversos processos patogênicos, frequentemente, se sobrepõem e levam à ativação de vias metabólicas que resultam em desequilíbrio angiogênico, lesão endotelial, estresse oxidativo e quadro inflamatório, resultando nos sinais e sintomas da PE (JUNG *et al.*, 2022). De acordo com Redman, Staff e Roberts (2022) o principal fator envolvido na etiologia é o estresse do sinciciotrofoblasto. Há estudos que defendem que a patogênese da PE de início precoce (<34 semanas), que ocorre em 5-20% de todos os casos da doença, está associada a desfechos mais graves e a uma placentação defeituosa, que gera a má perfusão uteroplacentária (KHODZHAIEVA *et al.*, 2016; BURTON *et al.*, 2019).

Por outro lado, a PE de início tardio (>34 semanas), que corresponde a cerca de 80% dos casos, teria relação com o envelhecimento e com a predisposição genética materna a síndromes metabólicas, que está associada à obesidade, hipertensão, resistência à insulina e quadro dislipidêmico-aterogênico, sendo que todos esses elementos culminariam no estabelecimento de estado inflamatório sistêmico, estresse oxidativo e disfunção endotelial característico da PE (KHODZHAIEVA *et al.*, 2016; BURTON *et al.*, 2019; MCLAUGHLIN *et al.*, 2018). Apesar dessa divisão em subtipos, a etiologia da doença pode variar entre as gestantes, resultado da interação de diferentes processos que ocorrem na placentação e diferentes características maternas para a doença (BURTON *et al.*, 2019).

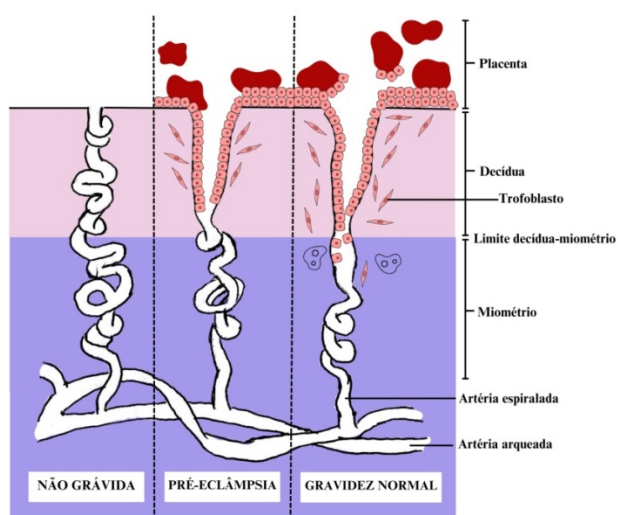
2.2.1. Isquemia uteroplacentária

O papel da isquemia uteroplacentária no mecanismo patogênico da PE e eclâmpsia vem sendo estudado há mais de 100 anos. Young (1914) demonstrou a presença de infartos placentários e a liberação de “toxinas” na circulação da mãe em decorrência do comprometimento do suprimento sanguíneo placentário e sugeriu a sua influência na etiologia da eclâmpsia. Atualmente, o papel da isquemia na patogênese da doença já é bem entendido e tem relação com a remodelação defeituosa das artérias espiraladas uterinas que resulta em má perfusão, provocando estresse oxidativo do sinciciotrofoblasto, tipo celular que recobre as vilosidades placentárias em contato com os vasos sanguíneos, com a consequente produção de citocinas pró-inflamatórias e fatores anti-angiogênicos (BROSENS *et al.*, 2011; MYATT; CUI, 2004; TANNETA *et al.*, 2017). Alexander *et al.* (2001) utilizou ratas grávidas para demonstrar

que a diminuição da perfusão uteroplacentária, por meio do uso de clipe de constrição na aorta em posição anterior a artéria uterina, provoca a redução do fluxo sanguíneo placentário em cerca de 40%, além de elevar a pressão arterial em aproximadamente 20-25 mmHg e diminuir a taxa de filtração glomerular com surgimento de proteinúria em muitos casos.

O processo de placentação é iniciado com a invasão do citotrofoblasto no endométrio (PAGE; VILLE; VILLE, 1972). Ocorre a invasão do sinciotrofoblasto, a nível profundo, ou seja, miométrico, o que permite uma extensa remodelação das artérias uterinas espiraladas e resulta em vasos de baixa resistência e maior calibre contribuindo para um alto fluxo sanguíneo, permitindo as trocas gasosas e de nutrientes com a circulação do feto (RANA *et al.*, 2019; BROSENS *et al.*, 2011). Por outro lado, na placentação anormal há defeitos na invasão trofoblástica e, conseqüentemente, o comprometimento da remodelação dos vasos sanguíneos levando à formação de artérias estreitas, com propensão à aterosclerose - presença de macrófagos carregados de lipídios, aumento de lipoproteínas de baixa densidade e triglicerídeos, infiltração linfocítica perivascular e necrose fibrinóide da parede vascular - (LAMBERT *et al.*, 2014; DE WOLF; ROBERTSON; BROSENS, 1975) (**Figura 1**). A eficácia do uso de aspirina na prevenção da PE tem forte relação com esse quadro, uma vez que esse medicamento previne a formação de trombos nas artérias espiraladas através do mesmo mecanismo proposto para a prevenção de infarto do miocárdio em pacientes com aterosclerose, reforçando o papel da isquemia uteroplacentária na patogênese da doença (ROLNIK *et al.*, 2017).

Figura 1 - Representação da remodelação das artérias uterinas espiraladas



Na gestação com PE ocorre defeitos na invasão trofoblástica com comprometimento na remodelação dos vasos sanguíneos levando ao estreitamento das artérias, o que reduz o fluxo sanguíneo na placenta. Na gravidez normal ocorre a invasão adequada do sinciotrofoblasto, o que permite extensa remodelação das artérias uterinas espiraladas com alto fluxo sanguíneo na região, resultando em eficientes trocas gasosas e de nutrientes entre a circulação materna e fetal. Fonte: Adaptação Mullet-King (2002).

2.2.2. Estresse oxidativo, disfunção endotelial e inflamação

A gravidez inicialmente ocorre em ambiente hipóxico, o que protege as células do feto do excesso de oxigênio, isso conduz, de forma natural, a um estresse oxidativo de baixo grau, também devido ao metabolismo placentário e aumento da atividade metabólica materna. Ademais, a hipóxia transitória também tem papel na formação de novos vasos, uma vez que estimula a invasão trofoblástica. No entanto, essa condição é contrabalanceada pela presença abundante de componentes antioxidantes (SHAH; KHALIL, 2015). Na PE, a hipóxia resultante da vascularização inadequada gera considerável estresse oxidativo em decorrência do desequilíbrio de espécies reativas de oxigênio (ROS) e antioxidantes. Vaughan e Walsh (2002) demonstraram o prejuízo nos mecanismos antioxidantes com a redução da expressão da superóxido desmutase, glutathione peroxidase, heme-oxigenase 1 e catalase em grávidas com PE, quando comparadas a gestantes de risco habitual. O aumento sérico de ROS resulta em lesões celulares, proteicas e peroxidação lipídica, o que contribui para o quadro de disfunção endotelial (WILLIAMSON *et al.*, 2017).

A disfunção endotelial consiste no comprometimento da homeostasia do endotélio com redução da capacidade de vasodilatação que pode ser associada tanto a alterações físicas quanto bioquímicas, como aumento da permeabilidade e rigidez vascular ou alterações na produção de mediadores relacionados à vasodilatação e vasoconstrição, como o óxido nítrico (XU *et al.*, 2021; DAIBER; CHLOPICKI, 2020). Desde os primeiros relatos entre 1980 e 1990 a disfunção endotelial é considerada a base das manifestações clínicas da PE (ROBERTS *et al.*, 1989). O estresse oxidativo decorrente da produção de ROS, que se caracteriza principalmente pela produção de superóxido, resulta em maior atividade apoptótica/necrótica, na liberação de debris e de fatores antiangiogênicos pelo sinciotrofoblasto (OLIVEIRA; KARUMANCHI; SASS, 2010). Essas substâncias liberadas ativam células do sistema imune, aumentam a adesão plaquetária e a vasoconstrição provocando ativação da resposta inflamatória e desequilíbrio entre os fatores angiogênicos e anti-angiogênicos que também têm forte relação com os sinais clínicos de disfunção endotelial (BOELDT; BIRD, 2017).

A reação inflamatória é conduzida pela produção de citocinas pró-inflamatórias. Moreno-Eutimio *et al.* (2014) demonstrou o aumento dos níveis séricos do fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-6 (IL-6) em grávidas com PE quando comparadas a mulheres com uma gravidez de risco habitual. O aumento de IL-6 estimula a produção e liberação de fibrinogênio e proteína C reativa (LIBBY, 2017). Ademais, Lamarca, Brewer e Wallace (2011), a partir da infusão de IL-6 em ratas grávidas provocaram quadro hipertensivo com proteinúria nos animais,

o que sugere a influência dessa molécula na fisiopatologia da PE. Foi observado também níveis aumentados de proteínas do sistema complemento, já que foi demonstrado em modelo animal que a inibição desse sistema restaura a capacitância das artérias espiraladas e reduz os níveis de receptor tirosina quinase do tipo solúvel (sFlt-1) (QING *et al.*, 2011). A disfunção endotelial causada por essas substâncias envolvidas no processo inflamatório discutidas anteriormente provoca o aumento da permeabilidade vascular, edema, reatividade dos vasos e elevação de moléculas relacionadas com a lesão do endotélio, como a fibronectina e a trombomodulina (REDMAN; SARGENT, 2008). A liberação dessas proteínas no organismo provoca mudanças no tônus muscular, hipertensão arterial, sobrecarga renal, produção de fatores pró-coagulantes com consequente acometimento sistêmico (NADERI; TSAI; KHANDELWAL, 2017).

Além disso, o quadro hipertensivo e a lesão vascular presentes na PE podem também estar relacionados à angiotensina II, substância com papel relevante na regulação da pressão arterial e de eletrólitos. A angiotensina II é produzida na placenta a partir da ação da enzima conversora de angiotensina, encontrada principalmente no sincitiotrofoblasto, sob a angiotensina I. Sua ação se dá pela interação com o receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1R) estimulando a vasoconstrição e vascularização (HONG *et al.*, 2021). Em uma gestação de risco habitual a angiotensina II circulante está aumentada e há um estado de não reatividade do endotélio a sua ação vasoconstritora. Na PE ocorre a redução dos níveis circulantes dessa substância e aumento de AT1R na musculatura dos vasos e na placenta, o que resulta no aumento da sensibilidade a vasoconstrição mediada pela angiotensina II. Além disso, o quadro de hipóxia presente na doença estimula a produção de autoanticorpos agonísticos ao receptor (AT1-AA), que se ligam ao receptor AT1R causando sua ativação e consequente aumento da vasoconstrição (LEAL *et al.*, 2022). Diversos estudos *in vivo* têm demonstrado que o AT1-AA desempenha um papel nas alterações vasculares, disfunção endotelial e outras lesões clássicas da PE (WANG; FENG e LIU, 2022). Novotny *et al.* (2012) admitiu que níveis elevados de AT1-AA se correlacionam com a gravidade da PE devido a sua associação com a presença de hipertensão, proteinúria, estresse oxidativo e elevação da produção de sFlt-1, um fator anti-angiogênico, sendo esses autoanticorpos um potencial alvo terapêutico para a PE.

2.3. Fatores angiogênicos relacionados à pré-eclâmpsia

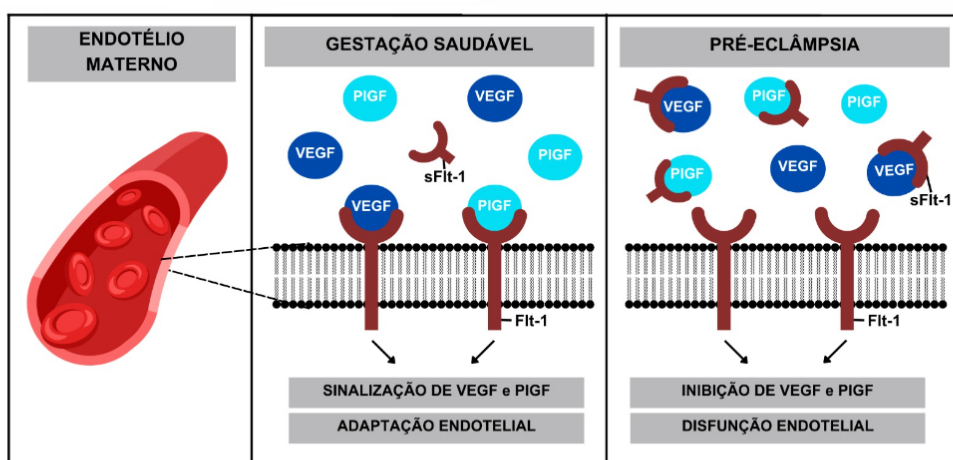
A angiogênese é caracterizada pela formação de novos vasos a partir dos já existentes, já a vasculogênese consiste na formação de vasos sanguíneos em locais onde não há vasos, a partir da proliferação de células precursoras do endotélio. Ambos os processos apresentam importante papel na homeostase, visto que o sangue é responsável pelo transporte de nutrientes para os tecidos, pela defesa imunológica, pela coagulação sanguínea e pela remoção de produtos do metabolismo (APTEN; CHEN; FERRARA, 2019). Durante o período gestacional, os hormônios, como gonadotrofina coriônica humana, estradiol e progesterona, as citocinas e os fatores de crescimento presentes no processo de placentação têm influência no processo de angiogênese. No entanto, a angiogênese é bastante dependente dos fatores pró-angiogênicos, peptídeos circulantes que atuam na regulação da formação de novos vasos, em maior proporção do que fatores anti-angiogênicos, que inibem a formação de novos vasos (BOELDT; BIRD, 2017; SOVIO *et al.*, 2017; HERRAIZ *et al.*, 2017).

Os fatores angiogênicos mais comumente estudados durante o desenvolvimento placentário são os membros da família VEGF (do inglês *vasculo-endothelial growth*): VEGF, PlGF (do inglês *placental growth factor*) e seus receptores, principalmente o receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR1), também conhecido como tirosina semelhante a fms (Flt-1) (OLIVEIRA; KARUMANCHI; SASS, 2010). O VEGF é um membro de uma família de diferentes proteínas, como o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C e PlGF, sendo que esse termo é utilizado para se referir ao primeiro citado - VEGF-A (FERRARA; ADAMIS, 2016). O VEGF estimula a angiogênese, a partir da sua ligação a Flt-1, e também promove a proliferação de células endoteliais, a partir de sua ligação ao receptor de domínio de inserção de quinase (KDR). Ambas as funções são bastante relevantes na remodelação vascular no período gestacional (GILLESPIE; PORTER; CHRISTIAN, 2017; LECARPENTIER; TSATSARIS, 2016). O PlGF é altamente homólogo ao VEGF e se liga apenas ao receptor Flt-1 (EHRlich *et al.*, 2017; LECARPENTIER; TSATSARIS, 2016).

Diversos estudos demonstram alterações na expressão de fatores angiogênicos em gestantes com PE, o que provoca comprometimento vascular placentário (SAHAY *et al.*, 2018). O estresse oxidativo da placenta pré-eclâmpsica altera o processo de angiogênese, uma vez que a hipóxia gerada estimula a produção de fator induzido por hipóxia (HIF), um importante regulador da expressão de VEGF (KIM; BYZOVA, 2014). O VEGF é alvo de estudos no contexto da PE devido a seu papel relevante na manutenção da função das células endoteliais, principalmente do endotélio fenestrado presente no cérebro, fígado e glomérulo, principais

órgãos afetados pela doença (ESSER *et al.*, 1998). Além disso, na PE foi encontrada uma diminuição dos níveis séricos de fatores pró-angiogênicos que se ligam à Flt-1: VEGF e PlGF quando comparado a uma gravidez de risco habitual (MAYNARD *et al.*, 2003; GILBERT; BABCOCK; GRANGER, 2007; MARCH *et al.*, 2015). Foi também observado um aumento de sFlt-1 que se liga ao VEGF e PlGF inibindo a sua ligação a Flt-1 e, portanto, bloqueando a ação pró-angiogênica desses fatores (HONG *et al.*, 2021; MAYNARD *et al.*, 2003) (**Figura 2**). Esse desequilíbrio entre fatores angiogênicos e anti-angiogênicos apresenta papel importante no desenvolvimento dos sinais clínicos de disfunção endotelial presente na PE (BOELDT; BIRD, 2017).

Figura 2 - Atuação dos fatores angiogênicos na fisiopatologia da PE



A ligação do VEGF ou PlGF ao receptor Flt-1 estimula a vasodilatação dos vasos sanguíneos e mantém o endotélio materno íntegro. A presença de sFlt-1 impede a ligação do VEGF e PlGF livres ao receptor Flt-1 e, consequentemente, a cascata de sinalização necessária para promover a vasodilatação materna. Fonte: Adaptação Lecarpentier; Tsatsaris, 2016.

2.3.1. Fator de crescimento placentário (PlGF)

O PlGF é uma glicoproteína dimérica, caracterizada pela presença de seis resíduos de cisteína em cada monômero, envolvidos por três ligações dissulfeto entre as cadeias gerando uma estrutura tridimensional conhecida como “nó de cistina” (IYER *et al.*, 2001). Essa proteína é a segunda VEGF identificada, a primeira foi o VEGF-A descrito em 1989 (LEUNG *et al.*, 1989). O gene PlGF humano foi mapeado no cromossomo 14q24 sendo formado por sete éxons que abrangem 13,7 quilobases, excluindo sequências reguladoras *upstream* e *downstream* (MAGLIONE *et al.*, 1993). Quatro isoformas são codificadas pelo gene PlGF através de *splicing* alternativo: PlGF-1, PlGF-2, PlGF-3 e PlGF-4, sendo todas primordiais no desenvolvimento embrionário (JARDIM *et al.*, 2015). A molécula de PlGF humano apresenta sequência de aminoácidos cerca de 40% similar ao VEGF-A, no entanto, foi identificada considerável semelhança entre as estruturas tridimensionais das duas proteínas (IYER *et al.*, 2001). O estímulo

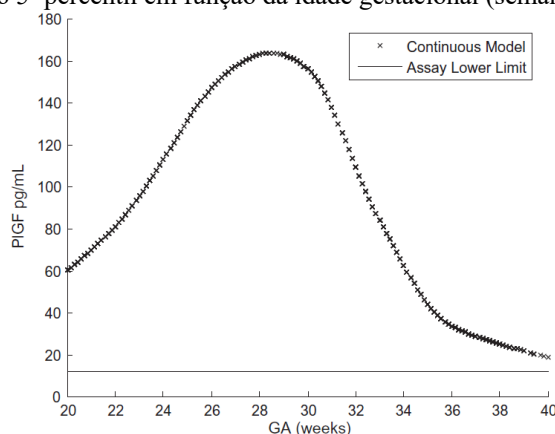
angiogênico dos membros da família VEGF está diretamente relacionado com a ligação e, consequentemente, dimerização e fosforilação, de dois receptores tirosina quinase: VEGFR-1 ou Flt-1 e VEGFR-2, sendo que o PlGF se liga exclusivamente a Flt-1 com alta afinidade (DE FALCO, 2012). Apesar de sua especificidade com Flt-1, o PlGF atua de maneira indireta em VEGFR-2, uma vez que se liga ao primeiro e desloca VEGF-A do receptor, tornando essa molécula disponível para se ligar a VEGFR-2 (CARMELIET *et al.*, 2001).

O PlGF é uma proteína com propriedades angiogênicas, secretada pelo sinciciotrofoblasto, que estimula a angiogênese placentária (HURRELL *et al.*, 2020). Além disso, essa proteína estimula diretamente as células endoteliais e interfere na função dos monócitos, uma vez que promove a diferenciação e ativação dessas células, que atuam no estímulo angiogênico e amplificam, de maneira sinérgica, a ação do VEGF (CLAUSS *et al.*, 1996; CARMELIET *et al.*, 2001). O PlGF é expresso fisiologicamente em nível reduzido em diversos outros órgãos, como coração, pulmão, tireoide e músculo esquelético (DE FALCO, 2012). Sorice *et al.* (2012) demonstraram que os níveis plasmáticos de PlGF podem ser influenciados por fatores ambientais, como idade, sexo e menstruação. Um aumento nos níveis de PlGF foi detectado com o envelhecimento, em pacientes homens em comparação ao sexo feminino e mais elevados em mulheres pós-menopausa do que pré-menopausa. Além disso, Pahlavani *et al.* (2023) propuseram que a prática de exercícios físicos pode prevenir a PE, uma vez que estimula o aumento níveis plasmáticos de PlGF em decorrência de mecanismos que promovem a modulação de placentocinas e exercinas, principalmente a apelina e a irisina. Estudos relatam também o papel do PlGF em diversas condições patológicas devido a sua expressão em células tumorais, cardiomiócitos, queratinócitos e células das retinas, podendo atuar na fisiopatologia de doenças como a aterosclerose, hipersensibilidade cutânea, obesidade, artrite reumatoide e retinopatias (DE FALCO, 2012; LIJNEN *et al.*, 2006; YOO *et al.*, 2009; VAN BERGEN *et al.*, 2019).

No que se refere ao período gestacional, as concentrações de PlGF se elevam gradativamente, atingindo seu pico entre 28º e 32º semana de gestação, seguindo com sua diminuição (SAFFER *et al.*, 2013) (**Figura 3**). O PlGF é tido como um bom preditor de adversidades perinatais, sendo sua redução plasmática associada à necessidade de parto cesariana em decorrência de comprometimento fetal, à internação em unidade de terapia intensiva neonatal e à natimortalidade (SHERRELL *et al.*, 2018). O papel importante do desequilíbrio dos fatores angiogênicos na fisiopatologia da PE é extensamente discutido. Teixeira (2007) reitera esse papel em sua pesquisa ao explicitar a relação direta entre a queda da concentração de PlGF e a elevação da pressão arterial média das gestantes. Além disso, o que se observa nessa doença é a redução

prematura da concentração de PlGF no sangue materno em relação a grávidas normotensas, que é detectável anteriormente ao início dos sintomas, demonstrando um papel promissor de biomarcador do PlGF (AGRAWAL *et al.*, 2019; RYAN *et al.*, 2018). A eficácia do uso do PlGF como biomarcador foi comprovada em diversas pesquisas, como no estudo prospectivo e multicêntrico PELICAN, conduzido com 625 mulheres. No referido estudo, concentração de PlGF <100pg/mL em 287 mulheres com menos de 35 semanas de gestação foi capaz de prever a necessidade de parto por diagnóstico de PE em até 14 dias, com sensibilidade igual a 96% (CHAPPELL *et al.*, 2013). Atualmente, a Rede Brasileira de Estudos sobre a Hipertensão na Gravidez (RBEHG) em seu Protocolo 03-2023 determina que uma análise isolada de PlGF <100pg/mL é definitiva para o diagnóstico da PE (PERAÇOLI *et al.*, 2023).

Figura 3 – Modelo paramétrico contínuo do intervalo de referência do PlGF (pg/mL) em grávidas de risco habitual mostrando o 5º percentil em função da idade gestacional (semanas)



A concentração de PlGF em pg/mL foi obtida utilizando como metodologia o imunoensaio de fluorescência (*Triage Test* - Alere, San Diego, EUA). Fonte: adaptado de Saffer *et al.* (2013).

2.3.2. Tirosina quinase do tipo FMS solúvel (*sFlt-1*)

A *sFlt-1* consiste na forma solúvel do receptor VEGFR-1 e se liga ao VEGF ou PlGF circulante inibindo a ligação com a forma insolúvel do receptor presente na superfície das células endoteliais e, conseqüentemente, não produz a cadeia de sinalização necessária para a ação de estímulo angiogênico dessas moléculas (**Figura 2**) (JENA *et al.*, 2020; JIM; KARUMANCHI, 2017). A *sFlt-1* foi originalmente identificada como uma proteína glicosilada de aproximadamente 100 kDa, produto de *splicing* alternativo do gene de 33 éxons que codifica *Flt-1* localizado no cromossomo 5, com transcrição truncada dentro do íntron 13 (*sFlt-1-i13*). A forma solúvel apresenta apenas o domínio extracelular, sem o domínio transmembrana e intracelular de tirosina quinase da molécula ativa de *Flt-1* (KENDALL; WANG; THOMAS, 1996; HUCKLE; ROCHE, 2004). Várias outras isoformas já foram identificadas, sendo a principal delas gerada por clivagem do éxon 15a (*sFlt-1-e15a*), que foi descrita como a expressa

de forma mais abundante na placenta humana pelo sinciciotrofoblasto e citotrofoblasto. Em grávidas normotensas a concentração de sFlt-1 se eleva fisiologicamente na circulação materna, desempenhando um papel protetor tanto para a placenta quanto para o feto, regulando um processo exacerbado de sinalização do VEGF que pode ser prejudicial (FAN *et al.*, 2014).

Por outro lado, o quadro hipóxico presente na placenta pré-eclâmpica, consequente à remodelação vascular anormal, leva a regulação positiva do gene Flt-1, que conduz a uma produção predominante da sFlt-1. Essa molécula está bastante relacionada à lesão órgão-alvo que ocorre na doença (ROBERTS; GAMMILL, 2005; PALMER; TONG; KAITU'U-LINO, 2017). A superexpressão do sFlt-1 tem forte relação com os mecanismos patogênicos que levam aos sintomas vasculares maternos, em decorrência do sequestro dos fatores pró-angiogênicos (ROBERTS; RAJAKUMAR, 2009). Acredita-se que a fonte da produção excessiva de sFlt-1 seja a placenta, já que os níveis circulantes dessa substância reduzem consideravelmente 48 horas após sua retirada, apesar de já se ter conhecimento que essa molécula também é produzida por células endoteliais, monócitos, células dendríticas e células epiteliais tubulares (VUORELA *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2005). Ao longo dos anos, diversos estudos em modelo animal demonstraram que o excesso de sFlt-1 provoca sintomas clássicos da PE, como a hipertensão arterial e a proteinúria (MAYNARD *et al.*, 2003; FAN *et al.*, 2014). A elevação da concentração de sFlt-1 ocorre cerca de 5 semanas antes do aparecimento dos sinais clínicos da PE, o que evidencia o potencial uso da avaliação de sFlt-1 na predição ou diagnóstico precoce dessa doença (BERGMANN *et al.*, 2010).

2.4. Predição de pré-eclâmpsia

Muitos dos sinais e sintomas clínicos da PE são inespecíficos e se confundem com os de outras doenças, como a hipertensão crônica e doença renal, o que dificulta o seu diagnóstico (VERLOHEN *et al.*, 2022). A RBEHG recomenda o início da prevenção antes da 16ª semana, com rastreio de marcadores clínicos de todas as gestantes (PERAÇOLI *et al.*, 2023). Ainda não existe teste preditivo com a confiabilidade necessária para ser aplicado universalmente, o que seria primordial para o estabelecimento do diagnóstico precoce da PE (MACDONALD *et al.*, 2022). Atualmente, é amplamente utilizado na triagem de primeiro trimestre os fatores de risco, como histórico familiar da doença, diabetes mellitus, hipertensão crônica, nova paternidade e nuliparidade, que são estabelecidos por organizações referências, como o Instituto Nacional de Saúde e Excelência no Atendimento (NICE) e o Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas (ACOG), tendo como base estudos epidemiológicos retrospectivos que associam

esses fatores de risco ao desenvolvimento de PE (ACOG, 2019; VISINTIN *et al.*, 2010; TAN *et al.*, 2018). O rastreio utilizando fatores de risco não gera custos e é um critério usado pelos médicos para eleger gestantes de alto risco para o uso de medicação preventiva, como, por exemplo, a aspirina. No entanto, a triagem de pacientes usando os fatores estabelecidos pelo NICE apresentou taxa de detecção de 40% para PE prematura, enquanto o teste seguindo recomendações da ACOG obteve taxa de detecção de apenas 5%, não sendo uma ferramenta eficiente de predição da doença (O’GORMAN *et al.*, 2017).

A combinação de fatores de risco maternos, dados clínicos e determinação de biomarcadores tem grande potencial para contribuir com a diminuição de internações, com a redução dos gastos médicos e com a melhora da qualidade de vida dessas gestantes (MACDONALD *et al.*, 2022; DROGE *et al.*, 2021). O modelo desenvolvido pela Fundação de Medicina Fetal, uma instituição inglesa de caridade que visa melhorar a saúde de mulheres grávidas e seus bebês, conhecido teste triplo FMF, é um exemplo que combina fatores maternos com a pressão arterial média, pulsatilidade das artérias uterinas e dosagem sérica de PlGF. O teste tem uma taxa de detecção de 90% para PE <32 semanas de gestação com desempenho avaliado em diversas populações, incluindo a brasileira (TAN *et al.*, 2018). Em países de baixa e média renda a PE é mais prevalente e uma causa relevante de mortalidade materna (DULEY, 2009). Além disso, a aplicação da triagem com critérios combinados é um desafio, já que as ferramentas foram desenvolvidas em países de alta renda e têm alto custo. O uso de biomarcadores, como o PlGF, representa um custo adicional e não estão prontamente disponíveis no sistema de saúde brasileiro. Assim, faz-se necessária a aplicação de estratégias que permitam a otimização dos custos e, consequentemente, a ampliação do acesso a esses exames para que ocorra a predição e diagnóstico precoce da PE (CHAEMSAITHONG; SAHOTA; POON, 2022; TAN *et al.*, 2018).

2.4.1. *Uso da razão sFlt-1/PlGF*

Atualmente, as moléculas de sFlt-1 e PlGF podem ser facilmente quantificadas no plasma ou soro por meio de ensaios imunométricos, como o ELISA (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*), a imunofluorescência e a quimioluminescência. Vários estudos têm demonstrado a aplicabilidade desses biomarcadores, tendo em vista o papel dos fatores angiogênicos na fisiopatologia da PE (SALAHUDDIN *et al.*, 2016). Rana *et al.* (2012) encontrou um Valor Preditivo Positivo (VPP) de 86% e um Valor Preditivo Negativo (VPN) de 87% para o valor de corte escolhido da razão sFlt-1/PlGF, que reflete o desequilíbrio entre fatores pró e anti-

angiogênicos. Um grande estudo multicêntrico prospectivo, conhecido como PROGNOSIS realizado por Zeisler *et al.* (2016), revelou que a relação sFlt-1/PIGF ≤ 38 pode ser usada em gestantes com fatores de risco, com precisão elevada para descartar o desenvolvimento de PE em até 7 dias após a determinação. Por outro lado, relação sFlt1/PIGF >38 , mais especificamente >85 em gestantes, representa grandes chances de desenvolver PE e necessita de maior atenção médica. Além disso, esses estudos demonstraram que a razão pode também ser utilizada na avaliação prognóstica, ou seja, para avaliar a possível ocorrência de complicações maternas e perinatais nos próximos 7 a 14 dias (LECARPENTIER; TSATSARIS, 2016).

Os diversos desfechos adversos da PE resultam em maior necessidade de internações para monitorização materna e do bem-estar fetal, de uso da Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) e de suporte ventilatório para o recém-nascido, gerando ônus econômico significativo (OLIVEIRA *et al.*, 2006; DIAS *et al.*, 2005). Sebastião *et al.* (2019) realizaram uma avaliação econômica do uso da razão sFlt-1/PIGF como auxílio na exclusão de PE, em um serviço privado de saúde no Brasil e concluíram que a aplicação desse teste resulta em decisões médicas mais assertivas, o que reduz os gastos com internações em 55% e, portanto, contribui para uma potencial redução de custos de cerca de 4.500 reais por paciente e de aproximadamente 137 milhões de reais em cinco anos. O uso clínico da razão sFlt-1/PIGF pode trazer benefícios para saúde da mulher e do bebê, uma vez que o acompanhamento poderá ser feito de maneira ambulatorial, em substituição à internação que expõe a gestante a uma situação de estresse, dificultando sua recuperação e trazendo prejuízo ao desenvolvimento cognitivo e motor da criança, o que pode também resultar em gastos tardios com cuidados em saúde (KOTROTSIOU *et al.*, 2001; SCHETTER; TANNER, 2012; POWE *et al.*, 2011).

A Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS), órgão responsável pela garantia do direito ao acesso a procedimento essenciais ao diagnóstico e tratamento dos beneficiários de planos de saúde, incorporou ao seu rol de tecnologias em saúde, no ciclo 2019/2020, o teste razão sFlt-1/PIGF. A incorporação foi feita em resposta à solicitação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC) e da Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO) e se aplica a gestantes com suspeita de PE e que se encontram entre a 24ª e 36ª semana de gestação. Cumpre ressaltar que o teste ainda não é acessível para a parcela da população que depende do Sistema Único de Saúde (SUS).

Ademais, é relevante destacar que atualmente poucas empresas possuem registro vigente perante a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para a comercialização de testes imunométricos que permitem a quantificação de sFlt-1 e PIGF. Os produtos aprovados para a determinação de sFlt-1 estão listados no **Quadro 1** e os produtos aprovados para a determinação

de PIGF estão descritos no **Quadro 2**. Todos os produtos com autorização da ANVISA para comercialização são importados e de alto valor agregado. Em consulta a laboratórios renomados no Brasil, realizada em dezembro de 2023, foi verificado que o custo do teste da razão sFlt-1/PIGF é de aproximadamente R\$ 2.000,00, o que os torna pouco acessíveis para uso clínico. Diante disso, projetos de pesquisa que visam nacionalizar a tecnologia de quantificação do sFlt-1 e PIGF são de grande importância, uma vez podem facilitar a implementação desses testes laboratoriais na rotina de pré-natal das gestantes, o que auxilia na triagem, diagnóstico precoce e prognóstico da PE, sendo uma ferramenta para a tomada de decisões clínicas antes mesmo do surgimento de sinais e sintomas da doença, o que contribui também para a redução da morbimortalidade materna e fetal.

Quadro 1 - Produtos aprovados pela ANVISA para a determinação plasmática de sFlt-1

Produto	Fabricante	Metodologia do teste
B·R·A·H·M·S sFlt-1 KRYPTOR®	B-R-A-H-M-S GMBH - ALEMANHA	Imunoensaio de fluorescência automatizado
DELTA Xpress® sFlt-1	WALLAC OY - FINLÂNDIA	Imunoensaio de fluorescência
Elecsys® sFlt-1	ROCHE DIAGNOSTICS GMBH - ALEMANHA	Imunoensaio de eletroquimioluminescência

Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/genericos/q/?nomeProduto=sFlt-1>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2024.

Quadro 2 - Produtos aprovados pela ANVISA para a determinação plasmática de PIGF

Produto	Fabricante	Metodologia do teste
DRG PIGF ELISA®	DRG INSTRUMENTS GMBH - ALEMANHA	Ensaio imunoenzimático
Triage PIGF Test®	Quidel - ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA	Imunoensaio de fluorescência
B·R·A·H·M·S PIGF PLUS KRYPTOR®	B-R-A-H-M-S GMBH - ALEMANHA	Imunoensaio de fluorescência
DELTA Xpress® PIGF	WALLAC OY - FINLÂNDIA	Imunoensaio de fluorescência
Elecsys® PIGF	ROCHE DIAGNOSTICS GMBH - ALEMANHA	Imunoensaio de eletroquimioluminescência

Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/q/?nomeProduto=PIGF>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2024.

2.5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Os imunoenaios enzimáticos (EIA), como o ELISA e a quimioluminescência, consistem em ensaios em que um reagente é imobilizado em fase sólida e a molécula responsável pela geração de sinal é uma enzima (BUTLER, 2000). Os EIA podem ser utilizados para identificar e quantificar moléculas em concentrações muito baixas, como proteínas, hormônios, vitaminas e medicamento que apresentam especificidade elevada contra anticorpos ou antígenos desenvolvidos para tais moléculas (AYDIN, 2015). Alguns avanços científicos foram importantes para a construção dessa técnica, dentre eles a produção de antígenos específicos e anticorpos monoclonais, que reconhecem um epítipo específico da molécula, e policlonais, que reconhecem variados epítipos de um antígeno (KONSTANTINO, 2017). A criação da técnica de detecção mediada por anticorpos ligados a um sinal radioativo foi a mais relevante, o chamado radioimunoensaio, primeiramente descrito por Yalow e Berson (1960) e utilizado na quantificação da insulina endógena. No entanto, as bases para o desenvolvimento desse teste foram descritas em 1941 (SHAH; MAGHSOUDLOU, 2016; COONS; GREEN; JONES, 1941). Apesar de ser uma técnica inovadora no contexto, ela necessitava de manuseio especial e poderia representar riscos à saúde sendo necessária a adaptação dessa metodologia sem o uso de elementos radioativos (SHAH; MAGHSOUDLOU, 2016).

A evolução na imunodeteção surgiu a partir de pesquisas que demonstravam que determinadas combinações de enzima-substrato produziam alterações de cor que eram quantificáveis e essas combinações poderiam ser ligadas a anticorpos que eram específicos para determinados antígenos (AVRAMEAS, 1969). A metodologia de ELISA foi primeiramente desenvolvida por dois cientistas suíços Engvall e Perlmann em 1971. Nessa técnica a marcação de antígenos ou anticorpos com iodo ¹²⁵ radioativo foi substituída pela marcação com enzima, sendo empregada em um ensaio para determinar as concentrações de IgG em soro de coelhos (ENGVALL; PERLMANN, 1971). Atualmente o ELISA apresenta aplicações variadas tanto na pesquisa, quanto também no laboratório clínico, sendo utilizado no diagnóstico de diversas doenças infecciosas, na avaliação de biomarcadores, incluindo os fatores angiogênicos e anti-angiogênicos e na quantificação de hormônios (HAYRAPETYAN *et al.*, 2023).

O princípio mais importante deste teste imunológico é a detecção de uma proteína alvo em uma amostra biológica a partir da ligação específica do antígeno de interesse ao anticorpo contra essa molécula, sendo a determinação realizada por mudança de unidade de luz relativa utilizando luminômetro, por densidade óptica utilizando um espectrofotômetro ou por observação

visual (HAYRAPETYAN *et al.*, 2023). A técnica apresenta sensibilidade bastante satisfatória e limite de detecção em escala inferior aos nanogramas (KONSTANTINO, 2017). Atualmente existem diversos sistemas automatizados para realização do teste ELISA, o que contribuiu para uma reprodutibilidade elevada e eficiência. As técnicas de ELISA são diversas e classificadas como direto, indireto, sanduíche e competitivo. A escolha do tipo de teste a ser utilizado depende principalmente da molécula alvo, da amostra que será utilizada e do objetivo da análise (HAYRAPETYAN *et al.*, 2023).

O ensaio direto apresenta a metodologia mais simples, ele é realizado em uma placa de poliestireno de 96 poços, assim como todos os outros tipos de ELISA. Esta placa é revestida com antígeno de interesse que será posteriormente detectado por um anticorpo que foi conjugado a uma enzima (KHOL; ASCOLI, 2017). A primeira etapa do teste consiste na adição e incubação do antígeno na placa, sendo que esse analito se adere ao plástico com o auxílio de um tampão. Após a adição do antígeno à placa são realizadas lavagens da placa com solução salina tamponada, em potencial hidrogênico (pH) neutro, o que é essencial para eliminar componentes não ligados, reduzir o *background* na detecção e garantir a especificidade do ensaio (SHAH; MAGHSOUDLOU, 2016). É necessário também bloquear os sítios ativos na placa para evitar ligações inespecíficas e minimizar a desnaturação. O bloqueio é feito com uma solução contendo proteínas, como albumina, gelatina, caseína ou leite desnatado, e detergente, por exemplo, Tween-20 (HAYRAPETYAN *et al.*, 2023).

O bloqueio é seguido pela adição e incubação do anticorpo específico marcado com uma enzima, mais comumente a peroxidase, que apresenta propriedade cromogênica. O anticorpo se liga ao antígeno presente no poço e essa etapa é seguida por lavagens da placa para remover o excesso de anticorpos que não se ligaram. Um substrato é adicionado, sendo o mais frequentemente usado em caso de aplicação da peroxidase o 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) e o peróxido de hidrogênio. O TMB sofre oxidação por radicais de oxigênio, gerados pela hidrólise do peróxido de hidrogênio pela HRP, produzindo cor (**Figura 4A**). A intensidade da cor pode ser avaliada visualmente em ensaios qualitativos ou ser medida por meio de um equipamento, o espectrofotômetro, sendo passível de ser quantificada, caso se faça uso de uma curva de calibração (KONSTANTINO, 2017). A utilização de controle positivo, amostra solúvel que contém o antígeno, e controle negativo, amostra que sabidamente não o apresenta, também é necessária para garantir que o teste foi realizado corretamente e que não houve contaminação em nenhuma das etapas (SHAH; MAGHSOUDLOU, 2016).

A metodologia indireta foi desenvolvida em 1978 por Lindstrom e Wager (LINDSTRÖM; WAGER, 1978). O ensaio indireto apresenta as etapas iniciais iguais ao do

ELISA direto: sensibilização da placa com antígeno, lavagem, bloqueio e adição da amostra que pode conter o anticorpo que se liga ao antígeno com consecutiva lavagem. Na etapa seguinte, ocorre a adição do anticorpo conjugado à enzima e contra o primeiro anticorpo, por isso a detecção é chamada indireta, uma vez que é feita a partir desse segundo anticorpo. Novas lavagens devem ser realizadas e por último deve ser adicionado o substrato, para que ocorra a produção de cor e leitura da densidade óptica (AYDIN, 2015) (**Figura 4B**). É importante ressaltar que é comum a utilização do complexo biotina-estreptavidina, principalmente nos ensaios indiretos e sanduíche. Nesta estratégia o anticorpo não é ligado diretamente a peroxidase, é ligado à biotina e, posteriormente, é adicionada à reação a estreptavidina marcada com a enzima peroxidase. A estreptavidina tem capacidade de se ligar a quatro moléculas de biotina cada, permitindo múltiplas ligações ao anticorpo secundário e, conseqüentemente, uma amplificação do sinal de detecção, com maior sensibilidade do teste (SHAH; MAGHSOUDLOU, 2016).

O ELISA sanduíche desenvolvido por Kato *et al.* (1977) tem esse nome porque em sua configuração o antígeno fica preso entre dois anticorpos. Na primeira etapa o anticorpo é adsorvido à placa com o auxílio do tampão. Esta etapa é seguida de lavagem e bloqueio. A amostra é então adicionada e incubada, podendo ou não conter o antígeno alvo, após a lavagem é adicionado um anticorpo de detecção (ligado à peroxidase ou biotina) no poço e novamente é realizada a etapa de lavagem. No caso da adição do anticorpo conjugado à enzima, a próxima etapa após a lavagem é a adição do substrato e leitura da densidade óptica (**Figura 4C**). Caso tenha sido utilizado o anticorpo biotinilado, após a lavagem é adicionada a estreptavidina marcada com enzima, a última etapa de lavagem é realizada e, por fim, a adição de substrato, culminando com a formação de cor e leitura da densidade óptica (HAYRAPETYAN *et al.*, 2023).

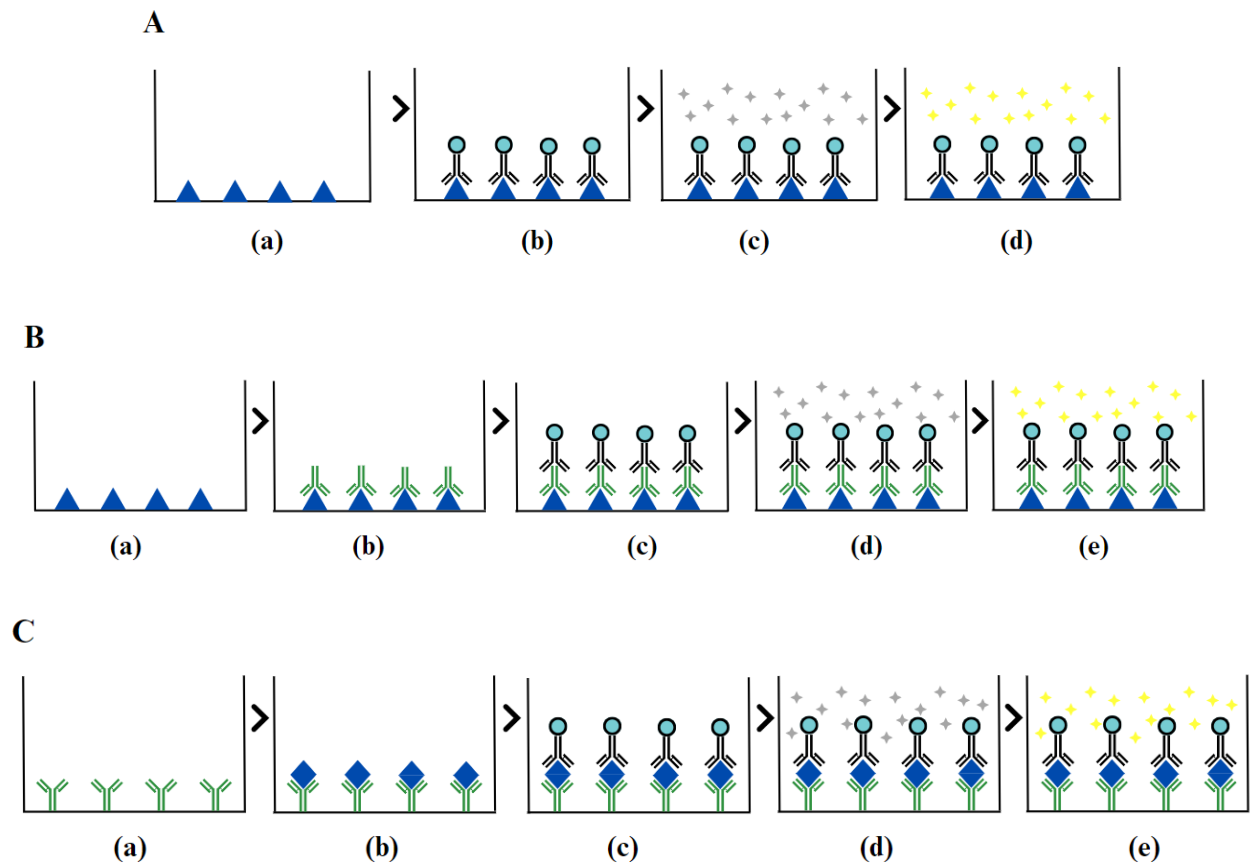
Figura 4 - Esquema simplificado dos principais tipos de ELISA

Figura 4A Esquema simplificado das principais etapas do ELISA Direto. **(a)** Adição e incubação da amostra ou padrão contendo o antígeno alvo que é imobilizado em cada poço da placa de 96 poços. **(b)** Adição e incubação do anticorpo específico para o antígeno de interesse marcado com a enzima, o anticorpo se liga ao antígeno adsorvido no poço. **(c)** Adição do substrato que sofre hidrólise enzimática. **(d)** A hidrólise enzimática do substrato resulta em mudança de cor que pode ser detectada por um espectrofotômetro. **Figura 4B** Esquema simplificado das principais etapas do ELISA Indireto. **(a)** Sensibilização da placa com o antígeno. **(b)** Adição e incubação da amostra que pode conter o anticorpo que se liga ao antígeno adsorvido na placa. **(c)** Adição e incubação do anticorpo conjugado à enzima e contra o anticorpo adicionado na etapa anterior. **(d)** Adição do substrato que sofre hidrólise enzimática. **(e)** A hidrólise enzimática do substrato resulta em mudança de cor que pode ser detectada por um espectrofotômetro. **Figura 4C** Esquema simplificado das principais etapas do ELISA Sanduíche. **(a)** Adsorção do anticorpo de captura à placa. **(b)** Adição e incubação da amostra ou padrão que pode conter o antígeno alvo que se ligará ao anticorpo adsorvido na placa. **(c)** Adição e incubação do anticorpo ligado à enzima **(d)** Adição do substrato que sofre hidrólise enzimática. **(e)** A hidrólise enzimática do substrato resulta em mudança de cor que pode ser detectada por um espectrofotômetro. Fonte: Elaborada pela autora.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver um teste imunométrico por metodologia ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) para a quantificação da concentração plasmática de fator de crescimento placentário (PlGF) em gestantes com alto risco de desenvolver pré-eclâmpsia.

3.2. Objetivos específicos

1. Propor e avaliar o desempenho das formulações dos diferentes reagentes que fazem parte do sistema imunométrico ELISA PlGF;
2. Definir os parâmetros: concentração, volume, tempo e temperatura das diferentes etapas do ensaio;
3. Avaliar o desempenho analítico do sistema quanto à: sensibilidade e estabilidade;

4. METODOLOGIA E RESULTADOS

4.1. Amostras biológicas

As amostras de soro e plasma (citratado, heparinizado e colhido em EDTA) utilizadas na parte experimental deste estudo são provenientes dos projetos citados abaixo e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP - UFMG):

- “Avaliação do polimorfismo do gene da NO-sintase endotelial e da síntese de óxido nítrico na pré-eclâmpsia” (ETIC 0530.0.203.00-09);
- Pré-eclâmpsia e polimorfismos dos genes do fator VII e do receptor de estrogênio” (ETIC 47/08);
- “Caracterização genética, imunológica, hemostática, bioquímica e angiogênica das gestantes com fatores de risco e/ou com pré-eclâmpsia atendidas nos Centros de Saúde do Distrito Oeste e na Maternidade Odete Valadares em Belo Horizonte/MG” – ECLIPSE. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG (CAAE 12471918.0.0000.5149) e da FHEMIG (CAAE 12471918.0.3002.5119) (**Apêndice A**).

4.2. Estudo de Coleta Longitudinal para Investigação de Pré-eclâmpsia (ECLIPSE)

O projeto ECLIPSE consiste em uma coorte prospectiva que teve início em novembro de 2021 e é coordenada pela professora Patrícia Nessralla Alpoim. Tem como objetivo principal avaliar vários biomarcadores laboratoriais relacionados ao diagnóstico e prognóstico da PE, em gestantes encaminhadas para o pré-natal de alto risco (PNAR) da Maternidade Odete Valadares (MOV) em Belo Horizonte.

Os alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado envolvidos no ECLIPSE selecionam e abordam as gestantes que atendem aos critérios de inclusão do projeto. As mulheres devem estar com idade gestacional entre 12-19 semanas e apresentar os fatores de riscos pré-estabelecidos, sendo necessária a presença de um critério considerado forte ou dois critérios

moderados (**Quadro 3**). Dentre os critérios de exclusão estabelecidos estão: gestantes que apresentarem distúrbios de coagulação, doenças autoimunes, doenças hepáticas e câncer. Além disso, são excluídas as pacientes que se manifestarem contrárias à sua inclusão nos estudos, mesmo após terem assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Quadro 3 - Critérios de inclusão de pacientes no projeto ECLIPSE

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	
FORTES	PE em gestação anterior Histórico de PE em parentes de primeiro grau Histórico familiar paterno de PE Doença renal crônica Diabetes mellitus Hipertensão arterial crônica
MODERADOS	Primigesta Limite extremo da idade fértil (< 18 ou > 35 anos na primeira gravidez) Primipaternidade Gestações múltiplas Tipo sanguíneo AB Etnia não caucasiana Intervalo longo entre as gestações (>10 anos) Presença de anticorpos antifosfolípidos IMC ≥ 35 kg/m ²

Fonte: elaborado pela autora

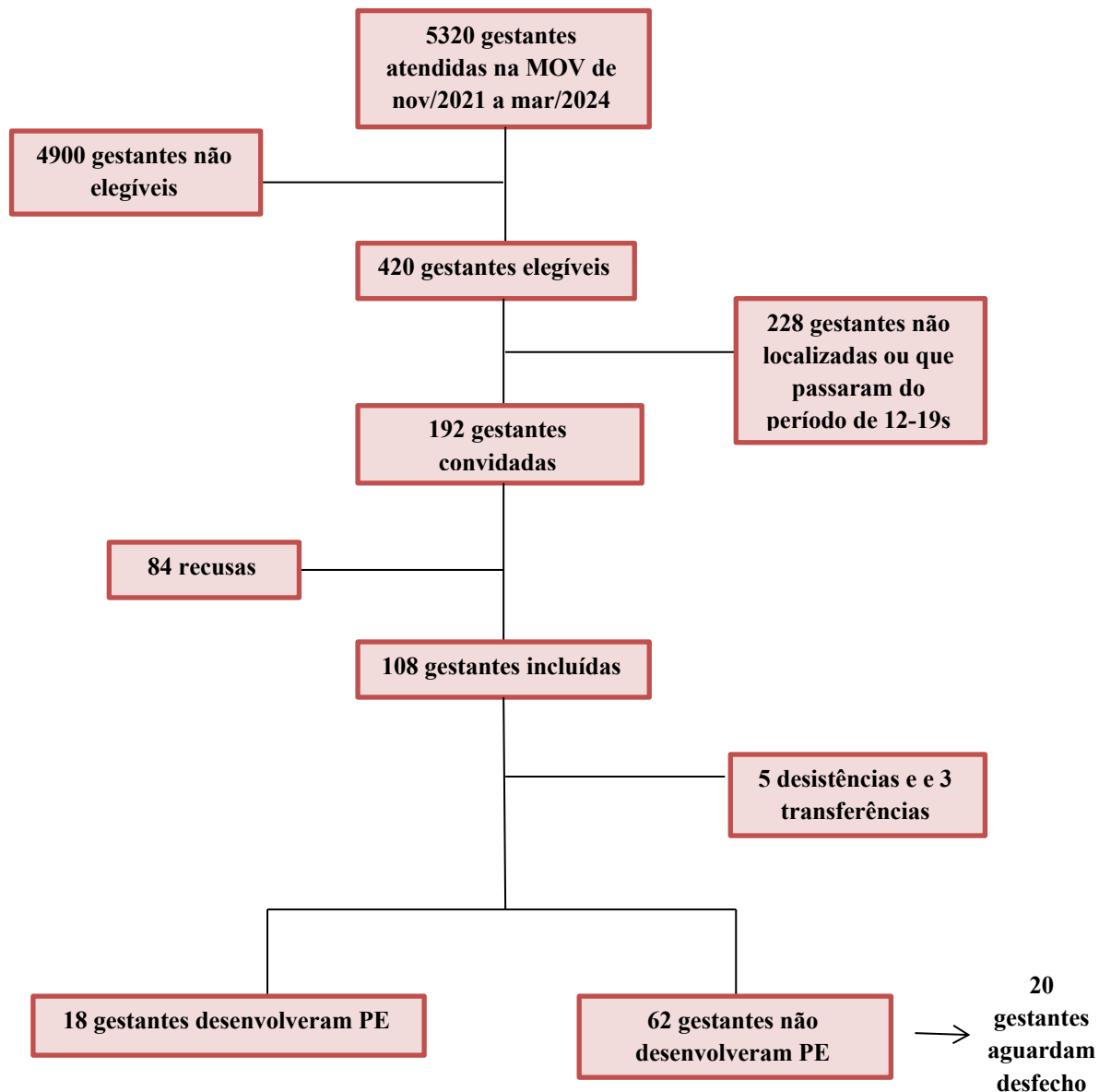
As gestantes selecionadas são convidadas a participar do projeto e, em caso de aceite, são solicitadas a assinar o TCLE ou Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) (**Apêndice B**). A partir do consentimento é iniciado o acompanhamento clínico da paciente. Obtêm-se os dados clínicos e laboratoriais de interesse em prontuários médicos, registra-se em ficha clínica (**Apêndice C**) e faz-se a coleta de amostras de sangue e urina em quatro períodos gestacionais pré-estabelecidos: 12-19 semanas, 20-29 semanas, 30-34 semanas e acima das 34 semanas. Caso a gestante venha a desenvolver PE é feita uma coleta adicional após o parto. As agendas médicas do PNAR são acompanhadas pelos pesquisadores e as datas das coletas são estabelecidas para o dia das consultas, com o intuito de facilitar a logística. Em cada período gestacional são coletados cinco tubos de sangue sendo dois de citrato, um de heparina, um de soro e um de EDTA, além de um frasco de urina.

O processamento das amostras tem início com a análise da urina em tira-reagente, seguida por centrifugação de todas as amostras de sangue e urina, no laboratório da MOV, de acordo com o Procedimento Operacional Padrão detalhado no **Apêndice D**. O soro, plasma e urina centrifugados são aliquoteados em criotubos e provisoriamente armazenados na MOV, em botijão

contendo nitrogênio líquido. Posteriormente, é feito o transporte desses materiais para o Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG onde as amostras são armazenadas em freezer -80°C.

É importante destacar que um dos objetivos do ECLIPSE é quantificar sFlt-1 e PlGF de todas as gestantes, utilizando o ELISA desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa. Até fevereiro de 2024, 108 gestantes foram inseridas no ECLIPSE, sendo que 62 não desenvolveram PE e 18 desenvolveram PE. Os dados detalhados estão representados no fluxograma a seguir (**Figura 5**).

Figura 5 - Fluxograma seleção ECLIPSE



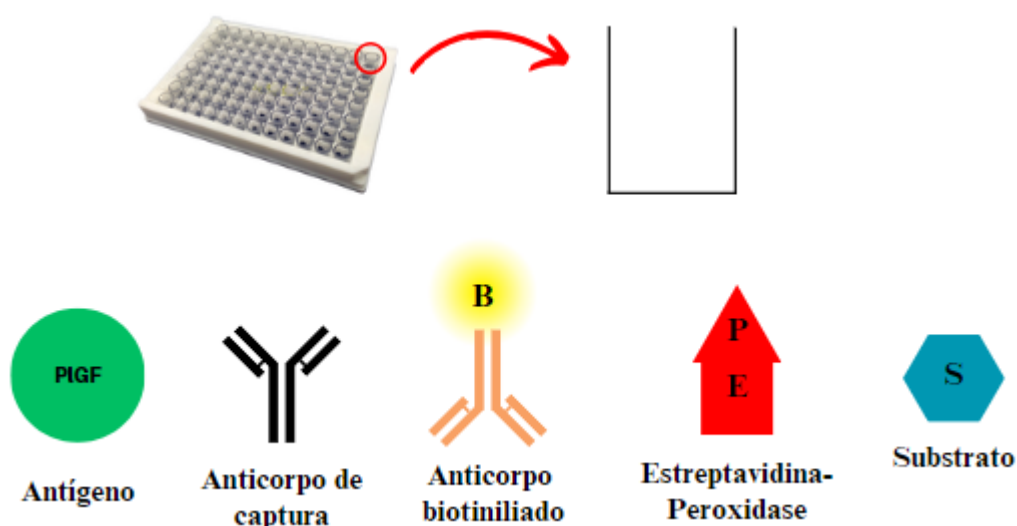
Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.Desenvolvimento e caracterização do Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

4.3.1. Etapas da metodologia ELISA

O presente estudo propõe o desenvolvimento de um teste ELISA do tipo sanduíche para determinar a concentração plasmática de PlGF em gestantes com alto risco de desenvolver PE. As etapas que compõem o desenvolvimento do ELISA estão descritas detalhadamente a seguir e os principais componentes esquematizados na **Figura 6**.

Figura 6 - Representação esquemática dos principais componentes do ELISA PlGF

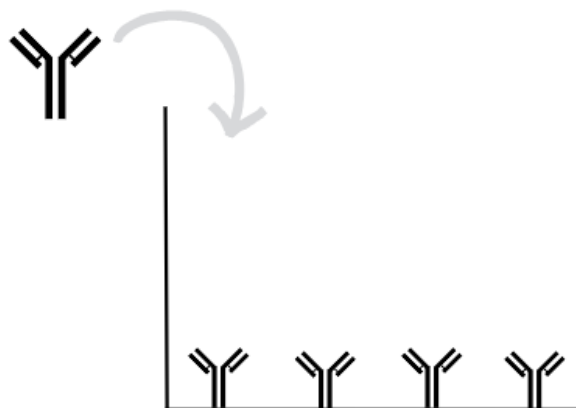


Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.1.1. Sensibilização da placa

A primeira etapa do teste consiste na ligação do anticorpo de captura à placa de poliestireno, o que compõe a fase sólida do sistema ELISA (**Figura 7**). O anticorpo de captura monoclonal (Human PlGF DuoSet ELISA - DY264 - Part No 840322 - R&D Systems) foi diluído em tampão fosfato (**Solução 1 - Apêndice E**), para uma concentração de 4µg/mL e 100µL desta solução foi adicionado à cada um dos poços da placa de poliestireno (Costar® - Referência 2592), sendo realizada em seguida uma incubação *overnight* à temperatura de 4°C.

Figura 7 - Representação esquemática da sensibilização da placa de ELISA PlGF



Representação esquemática da fase sólida do sistema ELISA em um poço da placa. A fase sólida é composta pelo anticorpo de captura ligado à placa de poliestireno. Fonte: Elaborada pela autora

4.3.1.2. Lavagem

A lavagem dos poços é feita com o intuito de remover o excesso de anticorpos que não se ligaram à placa e, assim, evitar uma possível interferência no teste. Foram realizados três ciclos de lavagem a partir da adição de 400µL/poço de uma solução tamponada descrita no **Apêndice E (Solução 2)**, seguida de aspiração feita manualmente até o experimento descrito na seção 4.3.2.13. Posteriormente, foi utilizada uma lavadora automática de microplacas (Asys Atlantis®). Após os ciclos de lavagem é necessária a secagem manual da placa por meio de inversão em papel toalha.

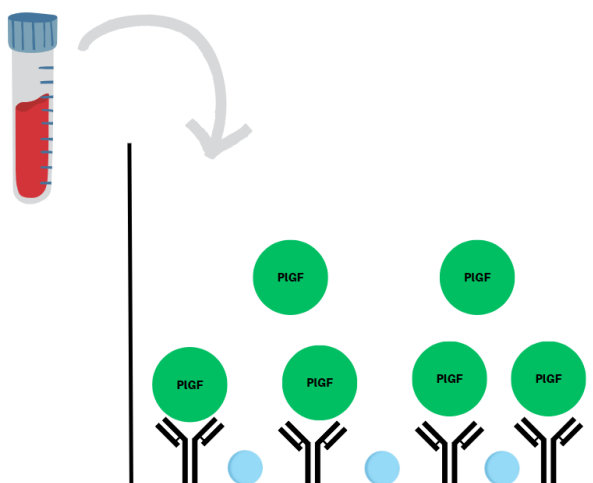
4.3.1.3. Bloqueio

O bloqueio da placa consiste na adição de proteínas ao poço da placa visando ocupar os sítios ativos remanescentes em que os anticorpos não se ligaram, evitando assim ligações inespecíficas nas etapas seguintes do ensaio. Dessa forma, foi adicionado 300µL de solução de bloqueio, descrita no **Apêndice E** como **Solução 3**. Após a adição do bloqueio, foi feita a incubação à temperatura ambiente (21°C) por pelo menos 1 hora. Em seguida, a solução foi descartada por inversão e a placa submetida à secagem à temperatura ambiente.

4.3.1.4. Adição da amostra

Foram adicionados 100µL/poço de soro, seguida por incubação de 2 horas à temperatura ambiente (21°C) (**Figura 8**).

Figura 8 - Adição da amostra na placa



Representação esquemática da adição da amostra no poço da placa de poliestireno. O anticorpo de captura, que compõe a fase sólida do sistema ELISA, se liga a molécula de PIGF presente na amostra. Os círculos azuis na imagem representam as proteínas presentes na solução de bloqueio que se aderem aos sítios ativos da placa em que os anticorpos de captura não se ligaram, como discutido na etapa de bloqueio descrita anteriormente. Fonte: Elaborada pela autora.

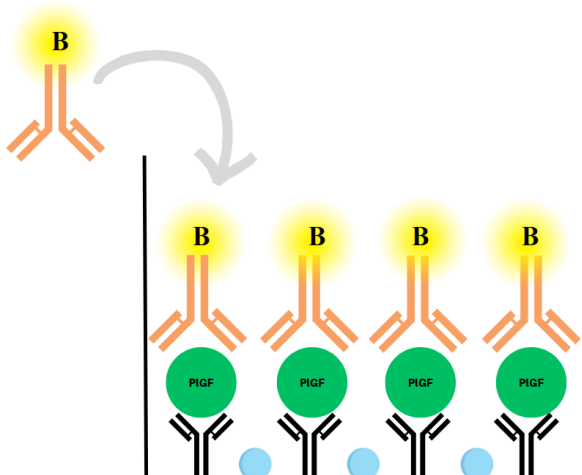
4.3.1.5. Lavagem

Repetição da etapa de lavagem como descrita na seção 4.3.1.2.

4.3.1.6. Adição do anticorpo ligado à biotina

Nesta etapa foi feita a diluição do anticorpo policlonal ligado à biotina (Human PIGF Duoset ELISA - DY264 - Part No 840323 - R&D Systems) na **Solução 3**, descrita no **Apêndice E**, para a concentração de 60ng/mL. Foi adicionado 100µL da solução a cada poço, seguindo com incubação de 2 horas à temperatura ambiente (21°C). Este anticorpo se liga ao antígeno de interesse capturado pelo primeiro anticorpo adicionado (**Figura 9**). A biotina terá uma função de amplificação do sinal ao se ligar à estreptavidina, como descrito no tópico 2.5.

Figura 9 – Representação esquemática da adição do anticorpo ligado à biotina



Representação esquemática da adição do anticorpo ligado à biotina. Nesta etapa, é feita adição do anticorpo ligado à biotina que se liga a molécula de PlGF que foi capturada pelo anticorpo presente na fase sólida. Fonte: Elaborada pela autora.

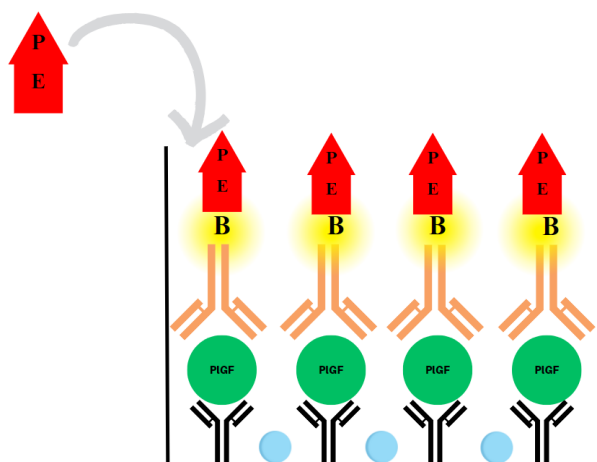
4.3.1.7. Lavagem

Repetição da etapa de lavagem como descrita no item 4.3.1.2.

4.3.1.8. Adição de estreptavidina-peroxidase

A estreptavidina-HRP (*Streptavidin-HRP* - DY264 - Part No 890803 - R&D Systems) foi diluída 200 vezes na **Solução 3**, descrita no **Apêndice E**. Posteriormente, 100µL/poço desta solução foi adicionada à placa, seguida por incubação de 20 minutos à temperatura ambiente (21°C). A estreptavidina se liga à biotina com alta afinidade e a peroxidase, que está conjugada a ela, atua sob o substrato para que ocorra a formação de cor (**Figura 10**)

Figura 10 – Representação esquemática da adição de estreptavidina-HRP no ELISA PIGF



Representação esquemática da adição de estreptavidina-HRP. A estreptavidina se liga com alta afinidade à molécula de biotina e a peroxidase é uma enzima que catalisa a hidrólise do peróxido de hidrogênio, um dos componentes do substrato. Fonte: Elaborada pela autora.

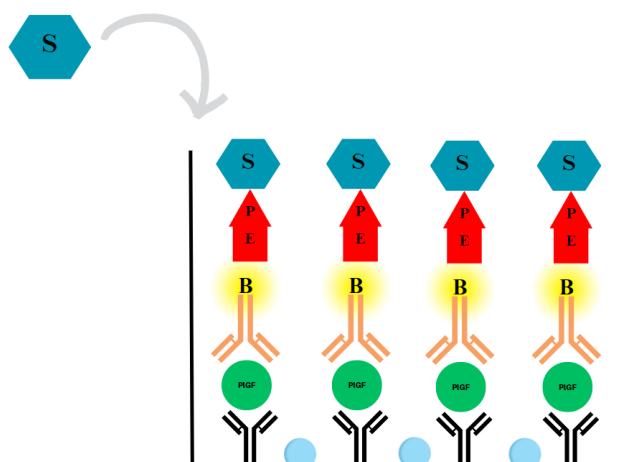
4.3.1.9. Lavagem

Repetição da etapa de lavagem como descrita no item 4.3.1.2.

4.3.1.10. Adição do substrato

O substrato consiste em uma solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (Sigma Aldrich® - Referência T0440). Após a adição de 100µL/poço da solução uma coloração azul pode ser observada, em consequência da oxidação do TMB por radicais de oxigênio, gerados pela hidrólise do peróxido de hidrogênio pela HRP, como descrito na seção 2.5. (**Figura 11**). A adição foi seguida de incubação à temperatura ambiente (21°C) durante 20 minutos, ao abrigo da luz, uma vez que o produto formado é fotossensível.

Figura 11 – Representação esquemática da adição do substrato à placa

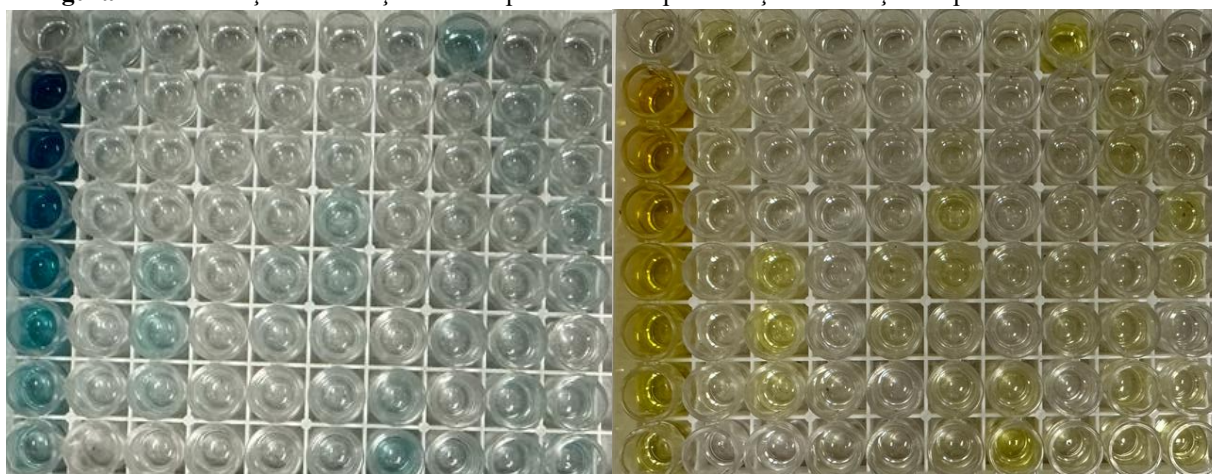


Representação esquemática da adição do substrato à placa. O substrato é composto por uma solução contendo solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio. Nesta etapa, ocorre a hidrólise do peróxido de hidrogênio por ação da enzima peroxidase, que está conjugada à molécula de estreptavidina, esta hidrólise resulta na liberação de radicais de oxigênio que oxidam o TMB gerando uma coloração azul no poço da reação. Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.1.11. Adição da solução de parada:

São adicionados 50µL/poço da solução de parada que contém ácido sulfúrico (**Solução 4 - Apêndice E**), no intuito de interromper a ação da enzima sob o substrato. Por fim, a cor se altera de azul para amarelo e por esse motivo a leitura da absorbância é feita a 450nm (**Figura 12**).

Figura 12 – Mudança de coloração de azul para amarelo após a adição de solução de parada em um ELISA



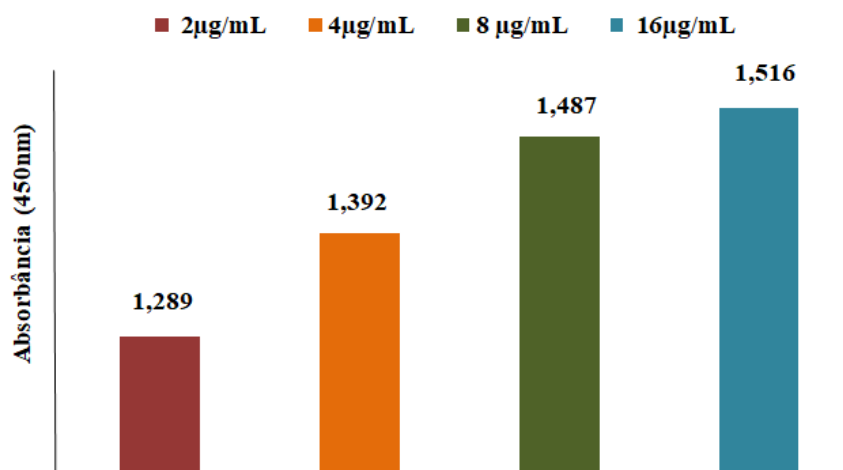
Fonte: Figura da autora.

4.3.2. Testes de avaliação do desempenho

4.3.2.1. Titulação do anticorpo de captura

Com o objetivo de se definir a melhor concentração do anticorpo a ser utilizada na fase sólida do sistema, foi realizada a titulação do anticorpo de captura. Para isso, seguiu-se o protocolo descrito no item 4.3.1, empregando como amostra um *pool* de soro produzido a partir de 59 amostras de gestantes, denominado *Pool 1*. A solução contendo o anticorpo de captura foi obtida por meio de diluição seriada (**Solução 1 - Apêndice E**) a partir da concentração de 16µg/mL até 2µg/mL. Os resultados deste teste estão demonstrados no **Gráfico 1**.

Gráfico 1 - Absorbâncias obtidas para o *Pool 1* em diferentes concentrações do anticorpo de captura



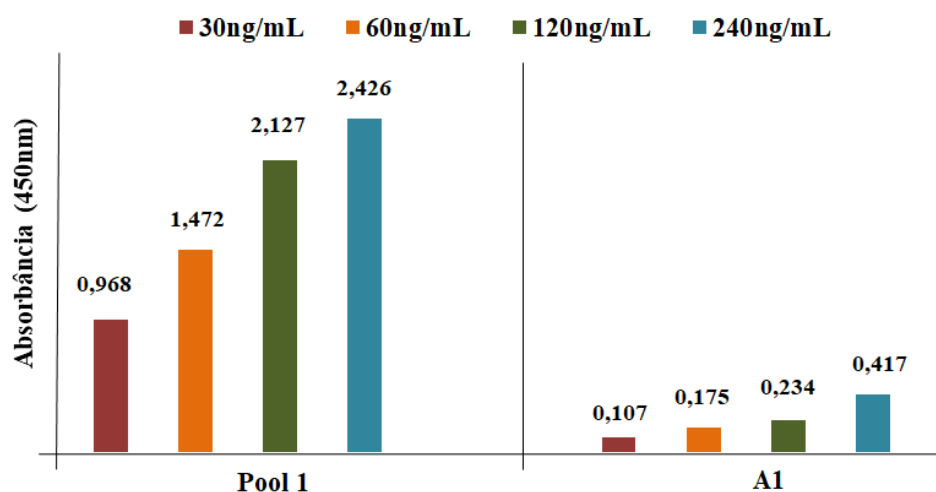
Após análise das absorbâncias obtidas, optou-se pela concentração de trabalho de 4µg/mL, que apresentou sensibilidade satisfatória para o ensaio.

4.3.2.2. Titulação do anticorpo ligado à biotina

A titulação do anticorpo ligado à biotina foi realizada a partir de diluição seriada utilizando a **Solução 3 - Apêndice E**. As concentrações testadas variaram de 30ng/mL a 240ng/mL, as amostras utilizadas foram o *Pool 1* e a Amostra 1 (soro de gestante com alto risco de desenvolver PE), seguindo o protocolo apresentado no item 4.3.1. Os resultados obtidos estão

descritos no **Gráfico 2** e permitiram concluir que a concentração de trabalho de 60ng/mL seria ideal para ser empregada no teste, uma vez que resultou em sensibilidade satisfatória.

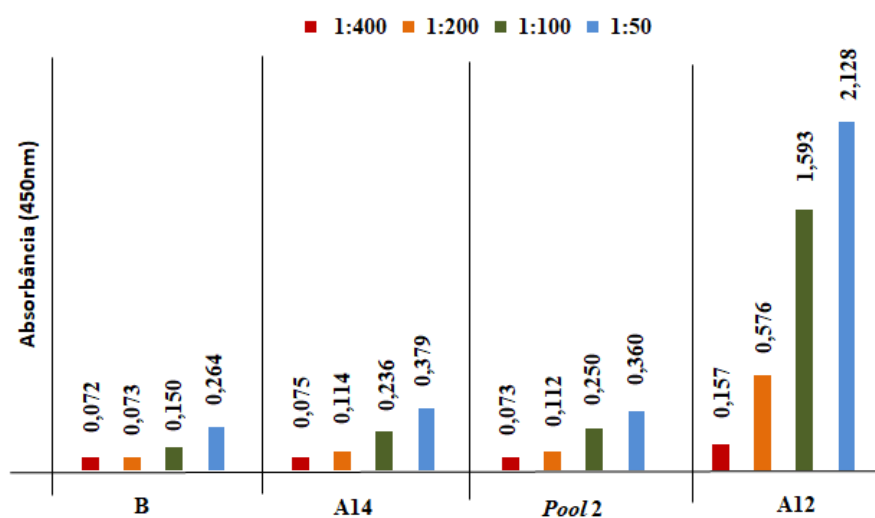
Gráfico 2 - Absorbâncias obtidas para o *Pool 1* e Amostra 1 em diferentes concentrações do anticorpo ligado à biotina



4.3.2.3. Titulação da estreptavidina-peroxidase

Com o objetivo de estabelecer a concentração de estreptavidina-HRP a ser empregada, realizou-se uma titulação a partir de uma diluição seriada de 1:400, 1:200, 1:100 e 1:50, utilizando como diluente a **Solução 3** do **Apêndice E**. As amostras ensaiadas foram: *Pool 2* (produzido a partir de amostras de 53 gestantes), A12 e A14 (plasmas de mulheres não grávidas, colhidos em EDTA). Como branco foi utilizado a **Solução 3** descrita no **Apêndice E**. O ensaio foi realizado conforme protocolo da seção 4.3.1 e os resultados estão reportados no **Gráfico 3**.

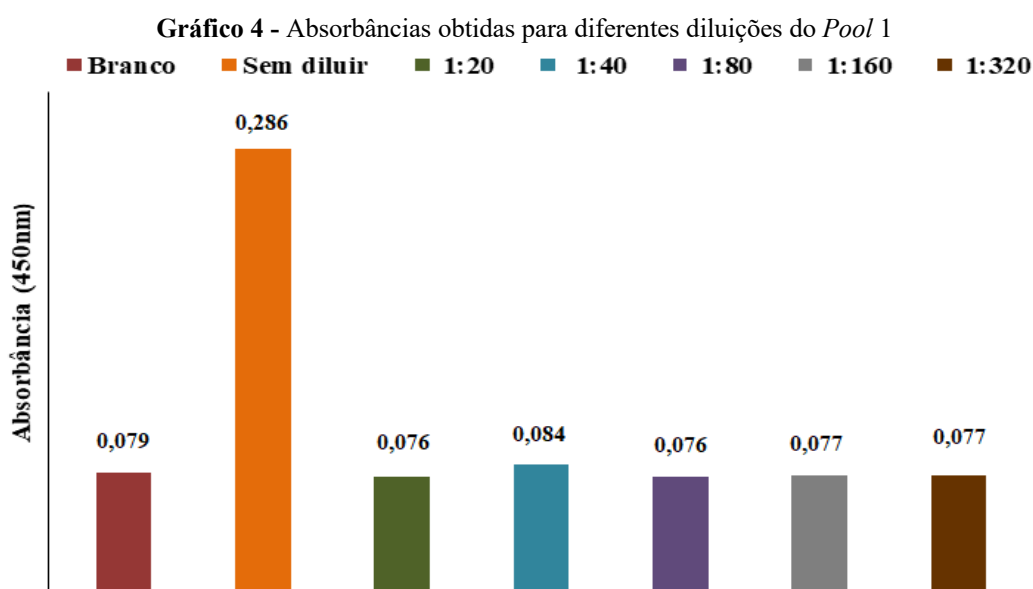
Gráfico 3 - Absorbância das amostras em diferentes diluições de estreptavidina-peroxidase



A partir da análise das absorbâncias optou-se pela diluição 1:200, que demonstrou sensibilidade satisfatória.

4.3.2.4. Diluição da amostra

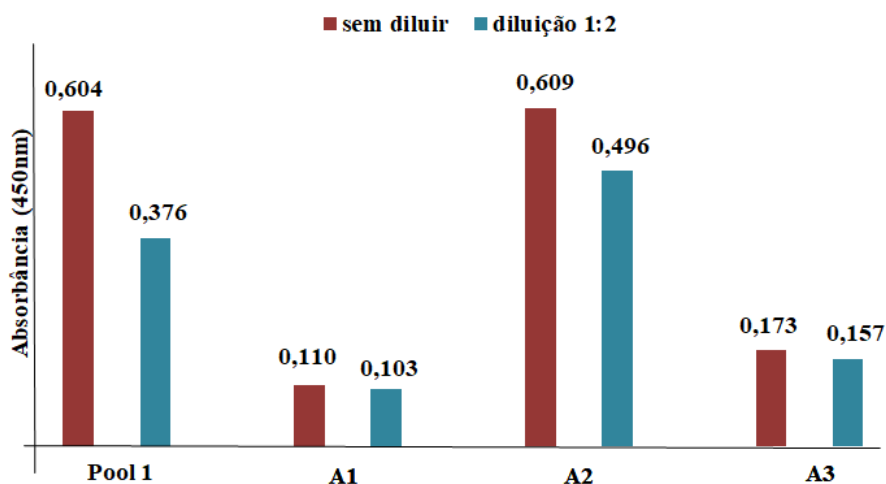
O *Pool 1* foi diluído em série a partir da diluição 1:20 até a diluição 1:320 com o intuito de avaliar o impacto das diluições na sensibilidade do teste. As amostras foram diluídas com a **Solução 3**, descrita no **Apêndice E**, que também foi utilizada como branco. O ensaio foi realizado conforme protocolo da seção 4.3.1 e os resultados obtidos estão descritos no **Gráfico 4**. Vale ressaltar que, excepcionalmente neste ensaio, a incubação da etapa de sensibilização foi realizada na temperatura de 21°C.



Os resultados obtidos demonstraram que as amostras diluídas apresentaram resposta semelhante ao branco. Assim, optamos pelo uso da amostra sem diluir ou menos diluída nos ensaios seguintes.

4.3.2.5. Comparação do uso da amostra sem diluir versus diluída 1:2

As amostras: *Pool 1*, A1, A2 e A3 (as duas últimas plasma de gestante com alto risco de desenvolver PE colhido em EDTA) foram testadas sem diluir e diluídas 1:2 na **Solução 3** descrita no **Apêndice E**. O experimento foi realizado de acordo com procedimento descrito no item 4.3.1. Os resultados estão apresentados no **Gráfico 5**.

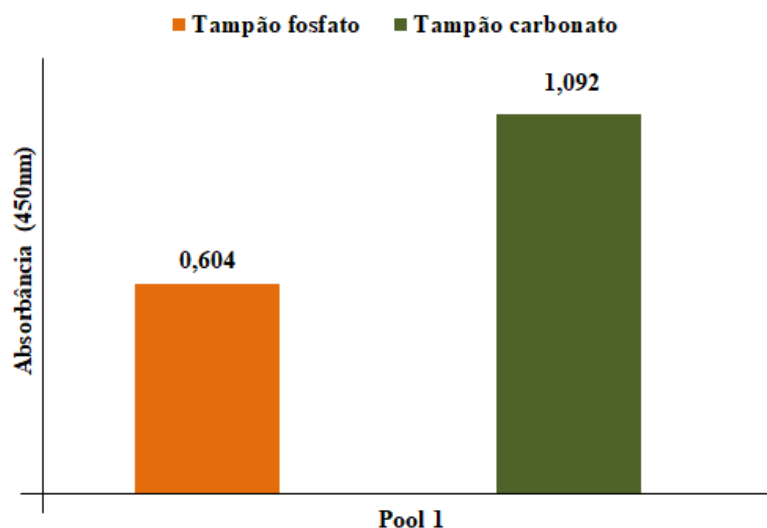
Gráfico 5 - Absorbâncias das amostras sem diluir e diluída 1:2

Após análise dos resultados, conclui-se que, mesmo diluindo as amostras numa proporção menor (1:2), as absorbâncias mantiveram-se mais baixas. Dessa forma, optou-se por utilizar amostras sem diluir nos próximos experimentos.

4.3.2.6. Sensibilização com tampão fosfato versus tampão carbonato

Neste experimento foi avaliado se a troca do tampão fosfato, **Solução 1 - Apêndice E**, pelo tampão carbonato, **Solução 5 - Apêndice E**, na etapa de sensibilização da placa, alteraria o desempenho do teste. O ensaio foi realizado seguindo o protocolo descrito no item 4.3.1, alterando somente o tampão empregado na sensibilização e utilizando o *Pool 1* como amostra. Os resultados estão expressos no **Gráfico 6**.

Gráfico 6 - Sensibilização usando tampão fosfato versus tampão carbonato

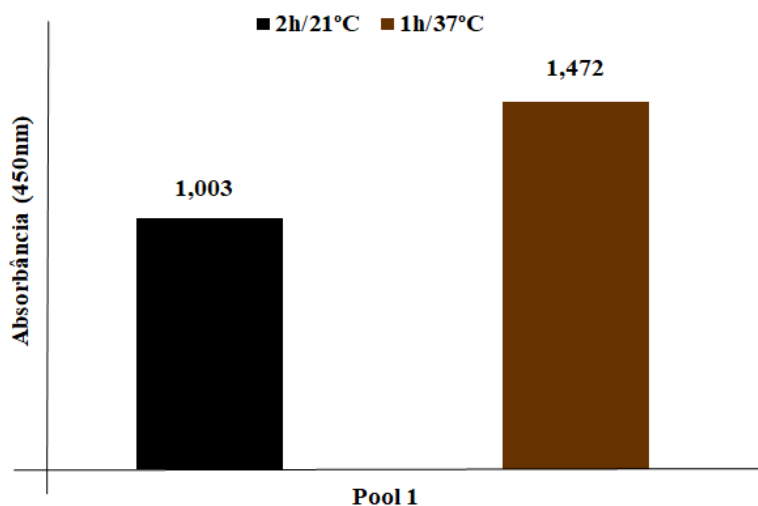


Tendo em vista os resultados obtidos, concluiu-se que a substituição do tampão fosfato pelo tampão carbonato impactou positivamente a sensibilidade do teste. Nos ensaios seguintes a sensibilização passou a ser feita com tampão carbonato.

4.3.2.7. Avaliação das condições de tempo e temperatura de incubação da amostra, anticorpo ligado à biotina e estreptavidina-peroxidase

Com o objetivo de reduzir o tempo gasto na realização do teste, característica importante para o consumidor final de um ELISA, dois experimentos foram realizados. Avaliou-se o impacto da redução do tempo e do aumento da temperatura de incubação em algumas etapas do ensaio. Um teste ELISA foi realizado utilizando-se o *Pool 1* como amostra, 2 horas de incubação a 21°C para as etapas de amostra e anticorpo ligado à biotina e 20 minutos a 21°C para estreptavidina-peroxidase. Um segundo ELISA foi executado utilizando-se o *Pool 1* como amostra, 1 hora de incubação a 37°C para as etapas de amostra e anticorpo ligado à biotina e 20 minutos a 37°C para estreptavidina-peroxidase. As demais etapas de ambos os ensaios foram realizadas de acordo com o protocolo descrito no item 4.3.1, com o uso do tampão carbonato na etapa de sensibilização como estabelecido no tópico anterior.

Gráfico 7 - Incubações 2h/21°C versus 1h/37°C

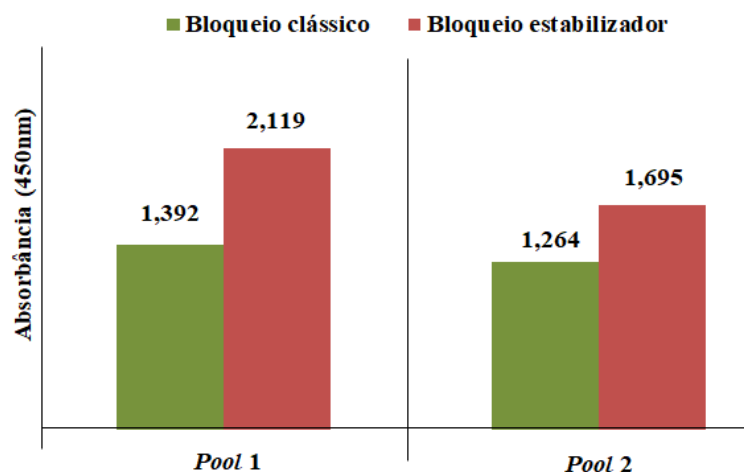


O **Gráfico 7** apresenta os resultados obtidos nos experimentos descritos acima. Ao analisar os resultados, concluiu-se que a redução do tempo e o aumento da temperatura de incubação foram benéficos para o teste, uma vez que as absorbâncias do *Pool 1* aumentaram quando comparadas ao experimento em que utilizou-se a incubação de 2h em temperatura de 21°C. Estes resultados mostraram que houve aumento da sensibilidade mesmo após relevante redução de 2 horas no tempo total de execução do ensaio. Dessa forma, para os ensaios seguintes, passou-se a utilizar a incubação de 1h a 37°C nas incubações de amostras e anticorpo ligado à biotina. Esta temperatura também passou a ser utilizada na incubação da estreptavidina-HRP.

4.3.2.8. Solução de bloqueio

Nos ensaios anteriormente descritos, a **Solução 3** (bloqueio clássico) foi utilizada como solução de bloqueio. Neste experimento foi testada uma nova formulação de bloqueio, a **Solução 6** descrita no **Apêndice E**. A nova solução contém matérias-primas que contribuem para uma maior estabilidade do anticorpo na fase sólida (bloqueio estabilizador), parâmetro que será avaliado em um próximo ensaio. Para a incorporação desta nova solução no conjunto diagnóstico foi avaliado se o seu uso afetaria a sensibilidade do teste. O experimento foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido no item 4.3.1, considerando as alterações citadas anteriormente e usando como amostras o *Pool 1* e *Pool 2*. As absorbâncias foram comparadas com as obtidas em um ensaio anterior, em que a **Solução 3** foi utilizada como solução de bloqueio. Os resultados estão apresentados no **Gráfico 8**.

Gráfico 8 - Bloqueio clássico versus Bloqueio estabilizador

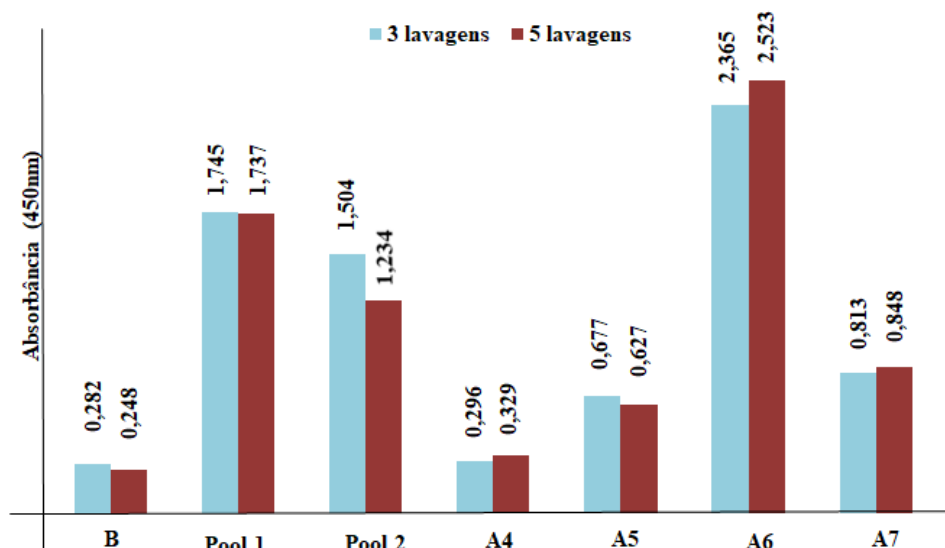


A avaliação dos resultados permitiu concluir que o uso da **Solução 6** não afetou a sensibilidade do teste e, portanto, foi utilizada nos ensaios seguintes como solução de bloqueio, com o objetivo de garantir maior estabilidade à fase sólida do ELISA.

4.3.2.9. Ciclos de lavagens

Com o objetivo de avaliar o impacto do número de ciclos de lavagens no *background* do teste fez-se um experimento aplicando-se três ciclos de lavagens e outro com cinco ciclos, ambos seguindo o protocolo descrito no item 4.3.1. A **Solução 3** descrita no **Apêndice E** foi usada como branco e como amostras foram utilizados o *Pool 1*, *Pool 2*, A4, A5 (as duas últimas, soro de paciente do sexo masculino), A6 e A7 (as duas últimas, soro de mulher não grávida). Os resultados estão apresentados no **Gráfico 9**.

Gráfico 9 - Impacto do número de ciclos de lavagens no *background* do teste

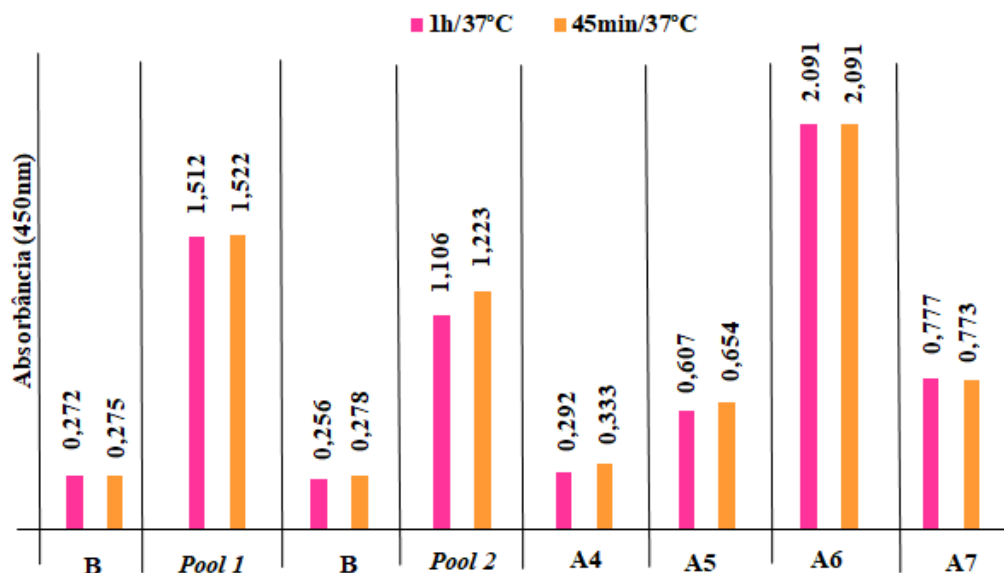


Os resultados obtidos demonstram que aplicar 5 ciclos de lavagem não diminui o *background* do teste. Dessa forma, visando a praticidade na execução do ensaio que está sendo desenvolvido, optou-se por manter 3 ciclos de lavagem.

4.3.2.10. Redução do tempo de incubação das amostras

Com a finalidade de otimizar o tempo de execução do ELISA, avaliou-se a redução do tempo de incubação das amostras de 1 hora para 45 minutos. O experimento foi realizado de acordo com o protocolo do item 4.3.1 e com as alterações definidas anteriormente. A **Solução 3** foi utilizada como Branco (B) e como amostras: *Pool 1*, *Pool 2*, A4, A5, A6 e A7, todas descritas anteriormente.

Gráfico 10 - Absorbâncias obtidas em diferentes tempos de incubação das amostras

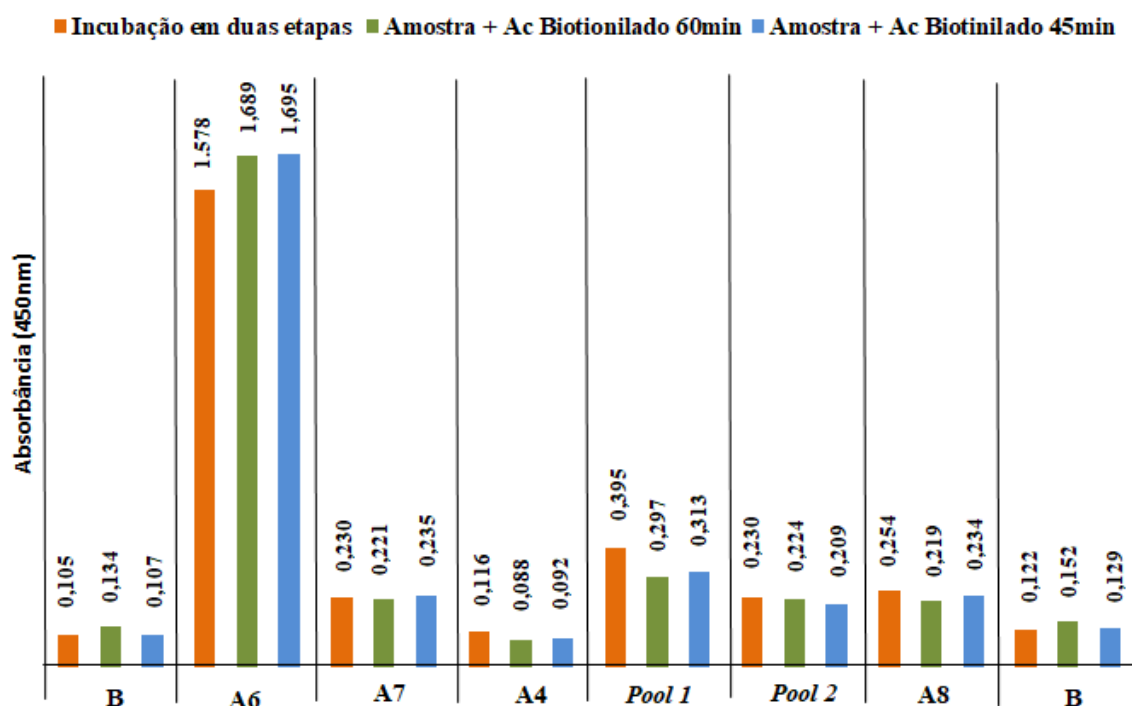


Os resultados descritos no **Gráfico 10** demonstram que a redução do tempo de incubação das amostras não impacta a sensibilidade do teste, sendo as absorbâncias equivalentes. Dessa forma, optou-se pela alteração da incubação para 45 minutos nos experimentos seguintes, diminuindo mais 15 minutos a execução do teste.

4.3.2.11. Incubação conjunta da amostra e anticorpo ligado à biotina

Como já citado anteriormente, o tempo de execução do ensaio é um fator importante para o consumidor final. Visando uma maior redução do tempo de realização do ELISA, foi feita a comparação de um ensaio aplicando-se a incubação separada da amostra e do anticorpo ligado à biotina com outros dois ensaios: (1) em que se incubou conjuntamente no poço estes dois componentes, durante 45 minutos e (2) em que se incubou conjuntamente no poço os dois componentes, durante 60 minutos. As amostras utilizadas já foram descritas anteriormente, com exceção da A8 (plasma citratado de mulher não grávida). Vale ressaltar que uma nova formulação do diluente do anticorpo ligado à biotina foi utilizada a partir deste experimento, **Solução 7 - Apêndice E**, contendo conservantes e matérias-primas que conferem estabilidade para o anticorpo. A **Solução 7** também foi utilizada como Branco (B) e diluente da estreptavidina-HRP. As demais etapas seguiram o protocolo descrito no item 4.3.1, acrescida das alterações estabelecidas nos experimentos anteriores. Os resultados obtidos estão descritos no **Gráfico 11**.

Gráfico 11 - Absorbâncias obtidas para a incubação separada *versus* incubação conjunta da amostra e anticorpo ligado à biotina

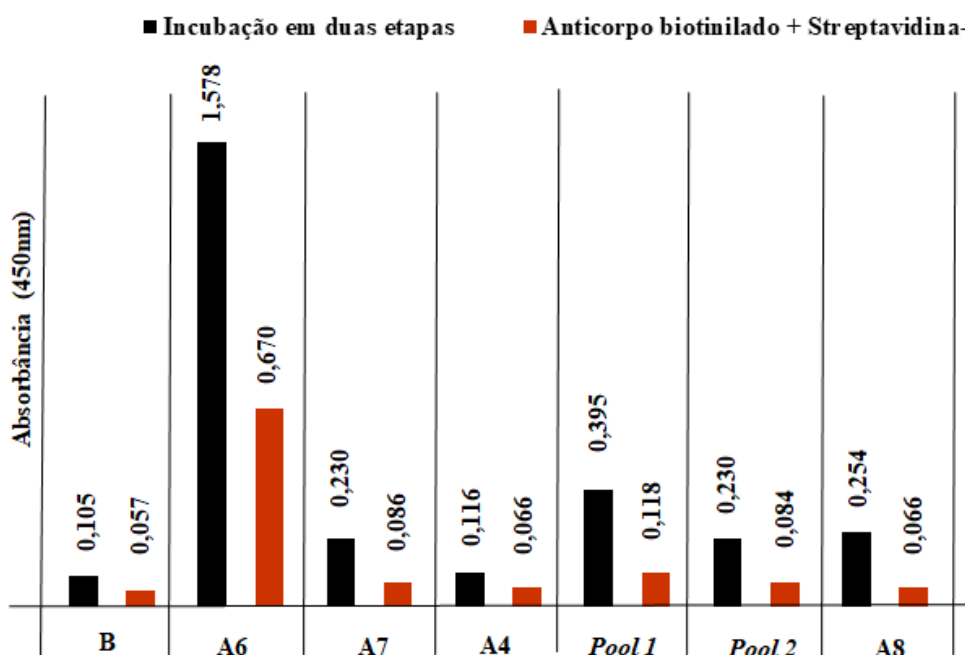


A incubação conjunta não promoveu alterações significativas nas absorbâncias obtidas. Dessa forma, para os ensaios seguintes foi adotada a incubação conjunta da amostra e anticorpo ligado à biotina, durante 45 minutos. Com esta alteração, a redução do tempo de execução do ELISA é mais uma vez otimizada. Além disso, a **Solução 7** também não afetou a sensibilidade passando a ser utilizada como diluente do anticorpo ligado à biotina e da estreptavidina-HRP nos ensaios seguintes.

4.3.2.12. Incubação conjunta do anticorpo ligado à biotina e estreptavidina-HRP

Com o mesmo propósito do ensaio descrito no item anterior, testou-se a incubação conjunta do anticorpo ligado à biotina e da estreptavidina-HRP. Foi realizado um ensaio com a incubação separada do anticorpo ligado à biotina e da estreptavidina-HRP (incubação de 45 minutos + 20 minutos respectivamente) e um segundo ensaio em que estreptavidina-HRP foi adicionada ao poço de reação imediatamente após o anticorpo ligado à biotina, sem incubação intermediária. A incubação de 45 minutos foi realizada somente após a adição do anticorpo ligado à biotina e da estreptavidina-HRP. As demais etapas seguiram o protocolo da seção 4.3.1 e alterações definidas até o item 4.3.2.11. A **Solução 7** (Apêndice E) foi utilizada como branco e as amostras já foram descritas anteriormente.

Gráfico 12 - Absorbâncias obtidas para incubação separada *versus* incubação conjunta do anticorpo ligado à biotina



Os resultados apresentados no **Gráfico 12** demonstram uma diminuição considerável das absorbâncias e, conseqüentemente, da sensibilidade do teste quando é feita a incubação conjunta do anticorpo ligado à biotina e estreptavidina-HRP. Optou-se por seguir o desenvolvimento do produto realizando a incubação conjunta da amostra com o anticorpo ligado à biotina e a incubação separada da estreptavidina-HRP.

4.3.2.13. Estabilidade da fase sólida

Neste ensaio foi avaliada a estabilidade da fase sólida do conjunto diagnóstico. Após as etapas de sensibilização e bloqueio, a placa foi testada no mesmo dia (dia 0) e, em seguida, foi armazenada em estufa a 37°C para ser testada 3, 7 e 10 dias depois. Todos os experimentos foram realizados seguindo o protocolo estabelecido no item 4.3.1 e considerando as alterações estabelecidas nos experimentos anteriores. A diluição do anticorpo ligado à biotina e da estreptavidina-HRP foi realizada no dia do teste e as amostras utilizadas foram armazenadas a – 20°C até o momento do ensaio. Foram utilizadas as amostras A4, A6, A7, Pool 1 e Pool 2, já descritas anteriormente e a **Solução 7** como Branco (B). As absorbâncias obtidas estão descritas no **Gráfico 13** e mais detalhadamente na **Tabela 1**.

Gráfico 13 - Absorbâncias obtidas no teste de estabilidade da fase sólida do ELISA

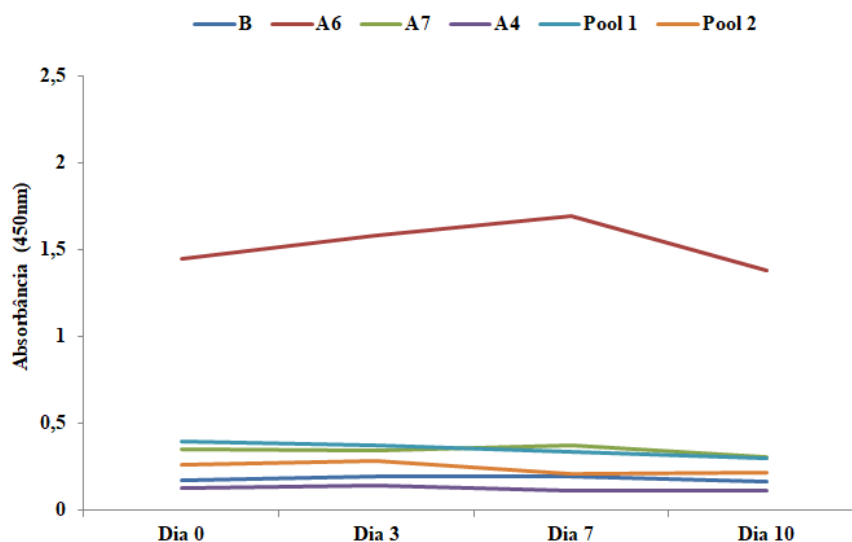


Tabela 1 - Absorbâncias obtidas no teste de estabilidade da fase sólida

Amostra	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 10	Variação percentual entre dias 0 e 10
Branco	0,169	0,194	0,193	0,163	-3,55%
A6	1,445	1,579	1,698	1,378	-4,64%
A7	0,352	0,34	0,371	0,309	-12,21%
A4	0,127	0,139	0,112	0,11	-13,38%
Pool 1	0,392	0,369	0,339	0,301	-23,21%
Pool 2	0,264	0,283	0,208	0,214	-18,94%

Os resultados apresentados no **Gráfico 13** e **Tabela 1** permitem afirmar que o anticorpo de captura apresentou boa estabilidade em fase sólida, com variação percentual média de 12,66% entre os dias 0 e 10, o que torna possível concluir que a placa permanece estável após sensibilização e bloqueio, por 1,09 anos quando armazenada a 5°C.

4.3.2.14. Estabilidade do anticorpo ligado à biotina

Este ensaio avaliou a estabilidade de uma solução de anticorpo ligado à biotina, pronta para uso. A solução de trabalho, de volume suficiente para a realização de 4 dias de ensaio, foi elaborada utilizando a **Solução 7 - Apêndice E** e concentração de anticorpo de 60ng/mL. Esta solução foi utilizada para a realização de um ensaio no mesmo dia do seu preparo (dia 0) e o volume restante foi armazenado em estufa à 37°C até o momento da realização dos demais experimentos, 3, 7 e 10 dias após o preparo. Todos os ensaios foram realizados nas mesmas condições estabelecidas no item 4.3.1 e considerando as alterações estabelecidas anteriormente.

A placa produzida para o ensaio foi mantida a 4°C e as amostras *Pool 2*, A4, A6, A7, A9, A10 e A11 (as três últimas soros de gestantes com alto risco de desenvolver PE), foram armazenadas a -20°C até o momento do teste.

Gráfico 14 - Absorbâncias obtidas no teste de estabilidade do anticorpo ligado à biotina

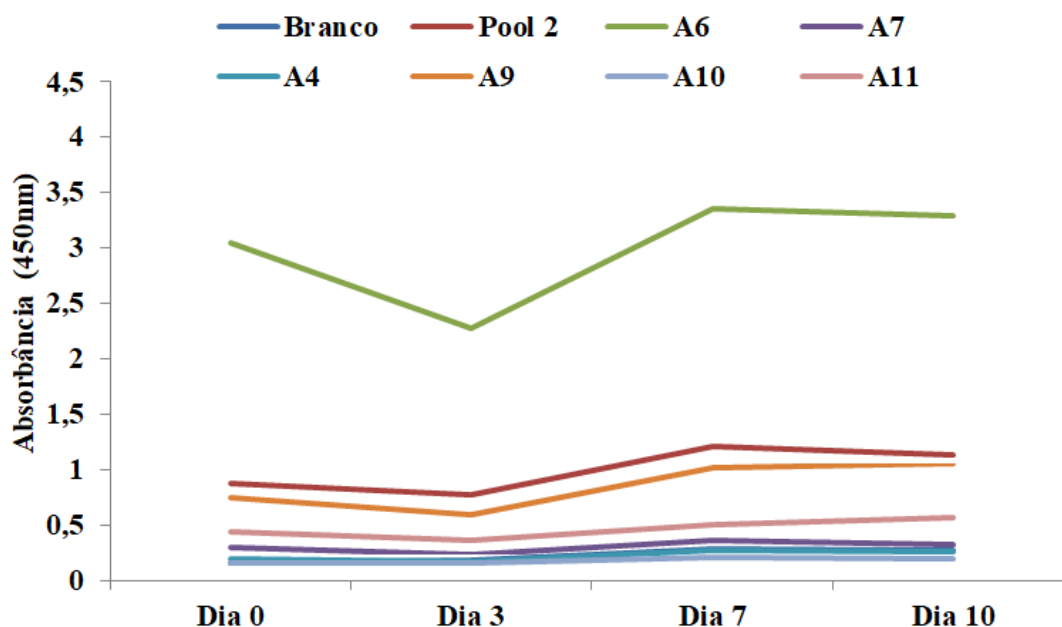


Tabela 2 - Descrição detalhada das absorbâncias obtidas e sua variação ao longo dos dias de teste da estabilidade do anticorpo ligado à biotina

Amostras	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 10	Variação percentual entre dias 0 e 10
Branco	0,16	0,175	0,281	0,267	66,90%
Pool 2	0,872	0,773	1,204	1,134	30%
A6	3,045	2,276	3,346	3,285	7,90%
A7	0,29	0,233	0,356	0,322	11%
A4	0,199	0,17	0,276	0,253	27,10%
A9	0,744	0,588	1,02	1,052	41,40%
A10	0,156	0,15	0,206	0,194	24,40%
A11	0,439	0,358	0,503	0,572	30,30%

A partir dos resultados apresentados no **Gráfico 14** e **Tabela 2**, concluímos que o anticorpo ligado à biotina apresenta uma promissora estabilidade com variação percentual média de aproximadamente 30% entre os dias 0 e 10. No entanto, essa variação percentual média não atendeu a faixa exigida pela *Federal Drug Administration*, como discutido posteriormente (FDA, 2018).

4.3.2.15. Estabilidade da solução estreptavidina-HRP

O experimento a seguir teve como objetivo avaliar a estabilidade da solução estreptavidina-HRP pronta para uso. Ao longo de 10 dias, diferentes soluções de *Streptavidin-HRP* 200x diluída foram submetidas à avaliação de estabilidade. As amostras A7, A12 (plasma de mulher não grávida colhido em EDTA) e A13 (plasma citratado de indivíduo do sexo masculino) foram utilizadas neste experimento. A **Solução 7** descrita no **Apêndice E**, foi usada como Branco.

As soluções avaliadas estão listadas a seguir, destacando-se o(s) diluente(s), bem como as tabelas nas quais estão apresentados os resultados.

- **Solução A:** 100% da **Solução 7** + estreptavidina-peroxidase 200x diluída. Os resultados estão descritos na **Tabela 3**;
- **Solução B:** 100% do estabilizador BioStab Antibody Stabilizer (Sigma Aldrich, Referência 55514) + estreptavidina-peroxidase 200x diluída. Os resultados estão descritos na **Tabela 4**;
- **Solução C:** 75% do estabilizador BioStab Antibody Stabilizer + 25% da **Solução 7** + estreptavidina-peroxidase 200x diluída. Os resultados estão descritos na **Tabela 5**;
- **Solução D:** 50% do estabilizador BioStab Antibody Stabilizer + 50% da **Solução 7** + estreptavidina-peroxidase 200x diluída. Os resultados estão descritos na **Tabela 6**;
- **Solução E:** 25% do estabilizador BioStab Antibody Stabilizer + 75% da **Solução 7** + estreptavidina-peroxidase 200x diluída. Os resultados estão descritos na **Tabela 7**;

Tabela 3 – Descrição detalhada das absorbâncias obtidas no teste da estabilidade da Solução A

Amostra	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 10	Variação percentual entre os dias 0 e 10
Branco	0,133	0,103	0,129	0,125	-6,01%
A12	1,259	1,03	0,809	0,937	-25,57%
A7	0,288	0,243	0,223	0,217	-24,65%
A13	0,1	0,093	0,093	0,077	-23%

Tabela 4 – Descrição detalhada das absorbâncias obtidas no teste de estabilidade da Solução B

Amostra	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 10	Varição percentual entre os dias 0 e 10
Branco	0,199	0,189	0,197	0,188	-5,52%
A12	1,823	1,599	1,775	1,822	-0,05%
A7	0,349	0,446	0,356	0,449	28,65%
A13	0,124	0,137	0,153	0,165	33,06%

Tabela 5 - Descrição detalhada das absorbâncias obtidas no teste de estabilidade da Solução C

Amostra	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 10	Varição percentual entre dias 0 e 10
Branco	0,15	0,129	0,148	0,151	0,66%
A12	1,669	1,461	1,508	1,508	-9,64%
A7	0,301	0,366	0,304	0,365	25,78%
A13	0,111	0,106	0,062	0,132	18,91%

Tabela 6 – Descrição detalhada das absorbâncias obtidas no teste de estabilidade da Solução D

Amostra	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 10	Varição percentual entre os dias 0 e 10
Branco	0,146	0,142	0,145	0,152	4,10%
A12	1,511	1,365	1,414	1,425	-5,69%
A7	0,269	0,316	0,278	0,342	27,13%
A13	0,106	0,11	0,11	0,119	12,26%

Tabela 7- Descrição detalhada das absorbâncias obtidas no teste de estabilidade da Solução E

Amostra	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 10	Varição percentual entre os dias 0 e 10
Branco	0,114	0,097	0,111	0,123	7,89%
A12	1,348	1,121	1,083	1,17	-13,20%
A7	0,257	0,279	0,257	0,288	12,06%
A13	0,098	0,098	0,062	0,096	-2,04%

A análise das tabelas anteriormente apresentadas nos permite concluir que as soluções diluentes avaliadas conferem, de maneira geral, boa estabilidade para estreptavidina-peroxidase diluída. A Solução E, quem contém 25% do estabilizador + 75% da **Solução 7** é a que apresentou melhor desempenho (variação percentual de 8,80% entre os dia 0 e 10) e passará a ser o diluente de escolha, nesse caso.

4.3.2.16. Curva de calibração

Neste experimento foi feita a construção de uma curva de calibração de 15 pontos com diferentes concentrações de padrão de PIGF (*Human PIGF Standard* - Part No. 840324 - R & D Systems). O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido no tópico 4.3.1, considerando as alterações estabelecidas nos experimentos anteriores. O padrão foi reconstituído em **Solução 3 - Apêndice E**, conforme estabelecido pelas instruções do fabricante. Para o ponto de 0pg/mL foi utilizada a **Solução 3**, mesmo reagente utilizado na diluição do padrão. Posteriormente, foi realizada a diluição seriada do padrão a partir da diluição 1:4 até a diluição 1:65536, o que correspondia às concentrações de 17.500pg/mL até 1,068pg/mL. Os resultados obtidos estão demonstrados na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Diluições, concentrações e absorbâncias obtidas nos pontos da curva padrão

Ponto	Fator de diluição	Concentração (pg/mL)	Absorbância
1	4	17.500	1.246
2	8	8.750	0.741
3	16	4.375	0.546
4	32	2.185	0.295
5	64	1.094	0.219
6	128	547	0.183
7	256	273	0.154
8	512	137	0.145
9	1024	68,4	0.145
10	2048	34,2	0.127
11	4.096	17,1	0.126
12	8.192	8,55	0.128
13	16384	4,27	0.134
14	32768	2,14	0.150
15	65536	1,07	0.126
16	0	0	0.161

Os resultados descritos na **Tabela 8** demonstraram uma baixa sensibilidade do teste. As absorbâncias obtidas do ponto 6 (546,875pg/mL) ao ponto 15 (1,068pg/mL) são semelhantes ao ponto de concentração 0pg/mL. Dessa forma, foi necessário realizar alterações nos parâmetros e soluções utilizadas no conjunto diagnóstico, no intuito de melhorar a sensibilidade do sistema.

4.3.2.17. Alterações nos parâmetros e soluções do conjunto diagnóstico

Diversas alterações nos parâmetros, soluções e concentrações dos componentes do teste foram realizadas e seus impactos na sensibilidade avaliados tanto separadamente quanto em conjunto. As alterações testadas estão listadas a seguir:

- Concentração do anticorpo de captura;
- Concentração do anticorpo ligado à biotina;
- Concentração da estreptavidina-peroxidase;
- Tempos de incubações;
- Temperatura de incubações;
- Condições de incubação - conjunta ou separada do padrão/amostra e anticorpo ligado à biotina;
- Formulação das soluções diluentes;
- Formulação do tampão de sensibilização;

Dentre as alterações avaliadas, a que demonstrou impacto significativo na sensibilidade do teste foi o retorno ao uso do tampão fosfato na etapa de sensibilização da placa, descrito como **Solução 1** no **Apêndice E**, que tinha sido substituído pelo tampão carbonato, descrito como **Solução 5** no **Apêndice E**, no experimento da seção 4.3.2.6. Além disso, em conjunto com a alteração do tampão de sensibilização, a retomada da incubação separada da amostra e anticorpo ligado à biotina por 45 minutos à temperatura de 37°C cada resultou em uma sensibilidade ainda mais satisfatória para o conjunto diagnóstico ELISA PIGF sendo também adotada. Na **Tabela 9** estão descritas as absorbâncias obtidas para a curva padrão em um experimento em que as duas alterações propostas neste tópico foram utilizadas no protocolo. Na reação de 0pg/mL foi utilizada a **Solução 3**, mesmo reagente utilizado na diluição do padrão. Ademais, foi realizada a diluição seriada a partir da diluição 1:4 até a diluição 1:65536, o que corresponde às concentrações de 17.500pg/mL até 1,068pg/mL.

Tabela 9 - Diluições, concentrações e absorbâncias obtidas nos pontos da curva padrão após as alterações do protocolo

Ponto	Fator de diluição	Concentração (pg/mL)	Absorbância
1	4	17.500	3.313
2	8	8.750	3.285
3	16	4.375	3.211
4	32	2.185	2.237
5	64	1094	1.331
6	128	547	0.809
7	256	273	0.524
8	512	137	0.400
9	1024	68,4	0.359
10	2048	34,2	0.298
11	4.096	17,1	0.278
12	8.192	8,55	0.304
13	16384	4,27	0.290
14	32768	2,14	0.286
15	65536	1,07	0.245
16	0	0	0.267

Os resultados descritos na **Tabela 9** demonstraram a otimização da sensibilidade do teste. No experimento descrito na seção anterior as absorbâncias obtidas a partir do ponto 6 da curva (546,875pg/mL) eram semelhantes ao ponto de concentração 0pg/mL, em contrapartida, o presente experimento foi sensível até o ponto 10 da curva (34,18pg/mL), sendo as demais absorbâncias semelhantes ao ponto 0pg/mL.

Dessa forma, foram escolhidos 7 pontos (34, 68, 136, 273, 546, 1093 e 2186pg/mL) para compor a curva de calibração do conjunto diagnóstico ELISA PlGF em desenvolvimento (**Gráfico 15**). Considerando o valor de R^2 de 0,9983, concluiu-se que a curva de calibração é satisfatória para o ensaio. Assim, o protocolo final do conjunto diagnóstico PlGF foi estabelecido e está esquematizado na **Figura 13**.

Gráfico 15 - Curva de calibração proposta para o ensaio

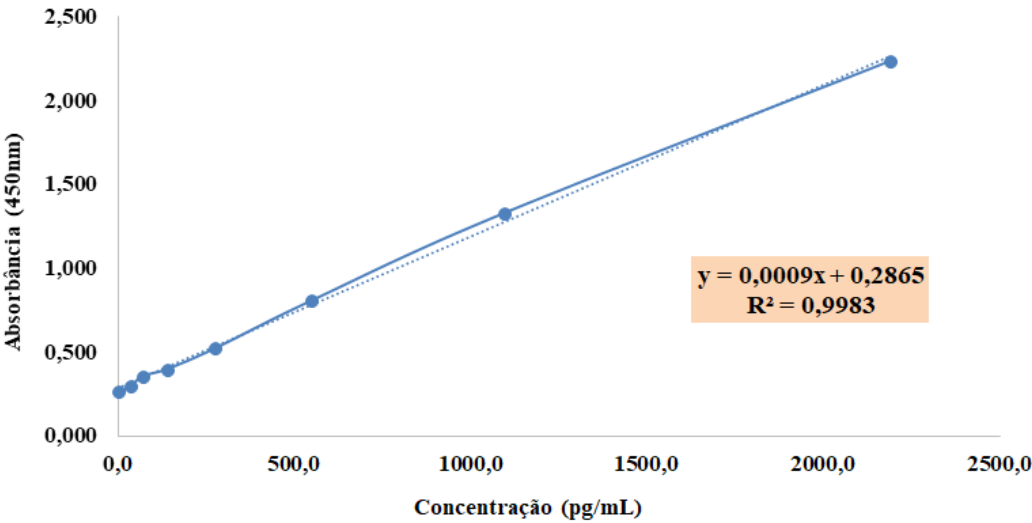
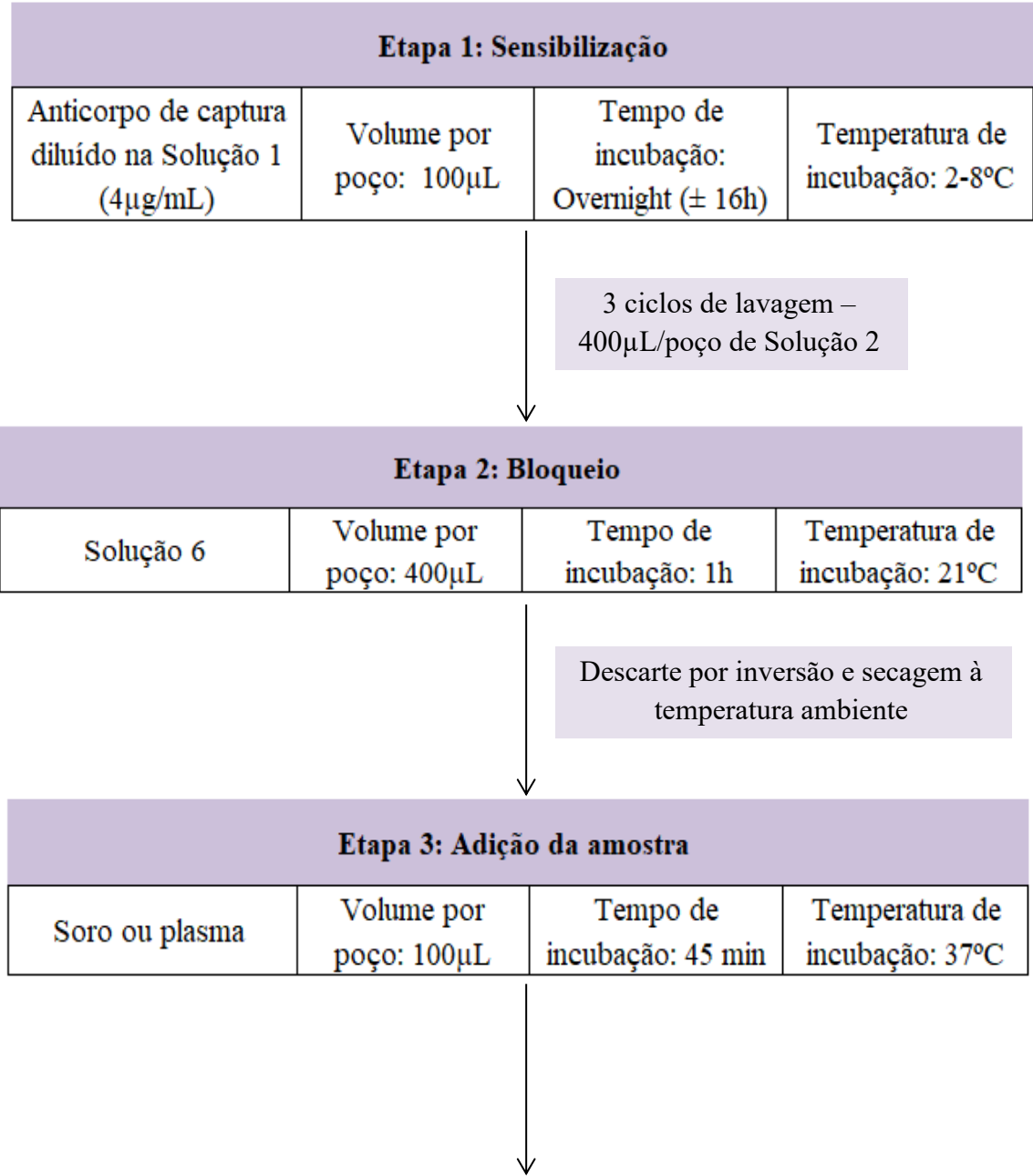


Figura 13 – Protocolo final do conjunto diagnóstico ELISA PIGF



3 ciclos de lavagem –
400µL/poço de Solução 2

Etapa 4: Adição do anticorpo ligado à biotina

Anticorpo ligado à biotina diluído em Solução 7 (60ng/mL)	Volume por poço: 100µL	Tempo de incubação: 45 min	Temperatura de incubação: 37°C
---	------------------------	----------------------------	--------------------------------

3 ciclos de lavagem –
400µL/poço de Solução 2

Etapa 5: Adição da estreptavidina-peroxidase

Estreptavidina-HRP 200x diluída em Solução 7	Volume por poço: 100µL	Tempo de incubação: 20 min	Temperatura de incubação: 37°C
--	------------------------	----------------------------	--------------------------------

3 ciclos de lavagem –
400µL/poço de Solução 2

Etapa 6: Adição do substrato

TMB e peróxido de hidrogênio pronto para uso	Volume por poço: 100µL	Tempo de incubação: 20 min	Temperatura de incubação: 37°C (ao abrigo da luz)
--	------------------------	----------------------------	---

Etapa 7: Adição de solução de parada

Solução 4	Volume por poço: 50µL	Leitura imediata a 450nm
-----------	-----------------------	--------------------------

Fonte: Elaborada pela autora.

5. DISCUSSÃO

O teste ELISA apresenta uma ampla aplicabilidade dentro dos laboratórios de análises clínicas e de pesquisa, sendo uma ferramenta eficiente na triagem e diagnóstico de diversas doenças, por ser um método rápido, fácil de ser executado, economicamente viável e com boa sensibilidade e especificidade (ALHAJJ; ZUBAIR; FARHANA, 2023). Diversos fatores interferentes podem ocorrer tanto na coleta das amostras utilizadas no teste, quanto nas diferentes etapas da sua execução, incluindo a qualidade do material da placa utilizada, tampão de sensibilização, anticorpo de captura, solução de bloqueio, anticorpo de detecção, enzima conjugada, tampão de lavagem e metodologia utilizada para detecção do sinal (AYDIN, 2015). Dessa forma, a validação dos *kits* de ELISA utilizados nos laboratórios é imprescindível tendo em vista que a validação tem o papel de avaliar parâmetros como, por exemplo, o pH das soluções, concentrações de substratos e possíveis interações cruzadas entre os reagentes que podem alterar a qualidade do teste. Além disso, a padronização dos protocolos utilizados também é primordial, já que diversas empresas produzem *kits* para detecção de uma mesma biomolécula utilizando metodologias diferentes e o uso de acordo com as instruções do fabricante evita potenciais erros analíticos (AKSOYALP; ERDOĞAN; AKSUN, 2023).

O Brasil ainda não detém a tecnologia necessária para fabricar testes imunométricos aplicáveis à determinação plasmática de PlGF e sFlt-1. Dessa forma, o país ainda é dependente da importação de *kits* de alto valor agregado, o que dificulta a ampla aplicação da razão sFlt-1/PlGF no sistema de saúde. Nesse contexto, foi proposto o desenvolvimento de um conjunto diagnóstico ELISA para a determinação plasmática de PlGF em gestantes com alto risco de desenvolver PE. Cabe ressaltar que em paralelo foi desenvolvido pela nossa equipe de pesquisadores o conjunto diagnóstico para a determinação plasmática de sFlt-1, também utilizado para a obtenção da razão sFlt-1/PlGF (MAIA *et al.*, 2023).

Ao longo do desenvolvimento do teste de ELISA para a determinação plasmática de PlGF foi necessário avaliar e padronizar diversos parâmetros, incluindo as concentrações e volumes das soluções reagentes, condições de incubação nas diferentes etapas, formulação das soluções, tipo de amostra empregada, etc. Foi necessário analisar também a estabilidade e sensibilidade do conjunto diagnóstico. Inicialmente, nos itens 4.3.2.1., 4.3.2.2. e 4.3.2.3. foi feita a titulação do anticorpo de captura, anticorpo ligado à biotina e estreptavidina-peroxidase com o objetivo de definir a concentração ideal destes componentes no teste. Os resultados permitiram definir o uso de 100µL de cada um deles nas seguintes concentrações: anticorpo de captura (4µg/mL),

anticorpo ligado à biotina (60ng/mL) e estreptavidina-peroxidase (diluição 1:200), uma vez que obtiveram uma sensibilidade considerada satisfatória.

Os resultados dos experimentos explicitados nas seções 4.3.2.4. e 4.3.2.5. demonstraram que a diluição das amostras usadas no ELISA reduz consideravelmente a sensibilidade do teste. Assim, foi sugerida a utilização de 100µL da amostra, sem diluir, por poço da reação. É importante destacar que o *Pool* 1 sem diluir apresentou uma maior absorbância no ensaio do item 4.3.2.5. (0,604) em comparação à obtida no item 4.3.2.4. (0,286). A diferença nas condições da incubação *overnight* da etapa de sensibilização da placa pode ser uma explicação para esses resultados, visto que no ensaio 4.3.2.4. ela foi realizada à temperatura de 21°C, enquanto no item 4.3.2.5. foi feita a 4°C. Dessa forma, a menor sensibilidade do teste relatado no item 4.3.2.4. pode se justificar pela degradação dos reagentes à temperatura ambiente.

No item 4.3.2.6. foi descrito um experimento que comparou o uso do tampão fosfato ou tampão carbonato na etapa de sensibilização. A substituição do tampão fosfato pelo tampão carbonato mostrou-se favorável, tendo em vista as absorbâncias obtidas em cada um dos casos (0,604 e 1,092, respectivamente). A opção por utilizar o tampão carbonato também é justificada por ser um reagente classicamente utilizado na sensibilização de placas nos ensaios ELISA, tendo como base o trabalho desenvolvido por Catt e Tregear (1967). O uso do tampão carbonato em pH próximo a 9 é o protocolo geralmente utilizado, uma vez que mantém os antígenos solúveis e com carga global negativa, para que possam se ligar a placa carregada positivamente (SHAH; MAGHSOUDLOU, 2016). Vale ressaltar que essa decisão foi refutada posteriormente, em decorrência de resultados obtidos na avaliação da curva de calibração do conjunto diagnóstico (seção 4.3.2.16.). Resultados que serão discutidos adiante.

O experimento realizado na seção 4.3.2.7. teve como objetivo aperfeiçoar as condições de incubação da amostra, anticorpo ligado à biotina e estreptavidina-peroxidase, reduzindo o tempo de realização do teste. Anteriormente, a incubação da amostra e do anticorpo ligado à biotina era feita por 2 horas a 21°C e a da estreptavidina-peroxidase, 20 minutos a 21°C. Um ensaio foi realizado substituindo a temperatura e tempo de incubação da amostra e anticorpo ligado à biotina para 1 hora a 37°C e alterando apenas a temperatura no caso da estreptavidina peroxidase para 37°C. A absorbância obtida para o *Pool* 1 aumentou de 1,003 para 1,472, o que demonstrou o impacto positivo, sendo a nova condição de incubação adotada para os experimentos seguintes, uma vez que além de aumentar a sensibilidade, também contribuiu com uma redução de 2 horas no tempo de execução do teste. A melhoria obtida neste ensaio pode ser justificada pelo aumento da temperatura de incubação do ensaio. A velocidade das reações químicas e físicas entre os componentes proteicos é aumentada quando o sistema é aquecido (MOTTA, 2011).

Uma nova solução de bloqueio foi sugerida no item 4.3.3.8., com o acréscimo de sacarose à formulação de bloqueio proposta anteriormente. Os açúcares têm função estabilizadora, característica amplamente explorada pela indústria farmacêutica e alimentícia, no processo de liofilização de proteínas (ABDUL-FATTAH; KALONIA; PIKAL, 2007). A imobilização da proteína em matriz de açúcar é capaz de desacelerar sua degradação química e física e conservar sua estrutura tridimensional. Além disso, os açúcares protegem a proteína dos fatores de estresse, como desidratação, temperatura e umidade, favorecendo o processamento e armazenamento (MENSINK, 2017). Ressaltamos que esse mesmo princípio justifica a substituição da **Solução 3** pela nova formulação de reagente diluente (**Solução 7 - Apêndice E**), a partir da seção 4.3.2.11., com o acréscimo de sacarose e manitol, que também é um carboidrato.

A estabilidade de um produto está relacionada à manutenção de sua qualidade e eficiência por um determinado tempo (BAGNO, 2021). Assim, é necessária a avaliação dos reagentes que estão sujeitos à degradação em decorrência de fatores de estresse como, por exemplo, temperatura e umidade para a padronização dos imunoensaios (KISAND et al., 2011). A lentidão da degradação do produto armazenado a baixas temperaturas não torna viável a avaliação em tempo real para definir se o produto é apto a ser comercializado dentro de um prazo de validade. Assim, ensaios de degradação acelerada são usualmente utilizados para prever a estabilidade, tendo sido aplicados neste trabalho. O ensaio foi realizado à temperatura de 37°C para acelerar a predição da vida útil dos reagentes e a análise foi feita com experimentos executados ao longo de 10 dias (BAGNO, 2021). A equação de Arrhenius é comumente usada nos ensaios de estabilidade, uma vez que o uso desta relação quantitativa permite a avaliação da temperatura comparada à taxa de degradação do reagente (KISAND et al., 2011).

As microplacas do teste de ELISA são comercializadas, em geral, já sensibilizadas no intuito de reduzir o tempo de execução do ensaio pelo consumidor final, sendo recomendado na instrução de uso fornecida pelas empresas o armazenamento destas placas em local refrigerado. A avaliação da estabilidade da fase sólida descrita no item 4.3.2.13. demonstrou, utilizando a equação de Arrhenius, que a placa sensibilizada e bloqueada do conjunto diagnóstico para determinação plasmática de PlGF é estável por 1,09 anos à temperatura de 5°C. Para a validação de ensaios de ligação, como o ELISA, é exigida a precisão em cada etapa de $\pm 20\%$ na avaliação de estabilidade, sendo que o conjunto diagnóstico apresentou variação percentual média (VPM) de 12,66% e, portanto, está dentro da faixa exigida (FDA, 2018).

No que se refere ao experimento de estabilidade do anticorpo ligado à biotina descrito na seção 4.3.2.14., a variação percentual média encontrada foi de aproximadamente 30%, apesar do valor absoluto obtido para o branco ter sido baixo e pequenas variações numéricas impactarem

consideravelmente nos valores relativos (variação percentual = 66,9%), o cálculo somente com as amostras ainda apresentou um VPM de 24%, fora do limite exigido. Será necessário repetir este ensaio posteriormente e testar uma nova formulação de diluente para este anticorpo. Esta formulação poderá conter, por exemplo, uma concentração aumentada de açúcares, que apresentam função estabilizadora. Poderá ser avaliado também se o uso de diferentes concentrações de um estabilizador nesta nova formulação pode impactar positivamente na estabilidade do anticorpo ligado à biotina, como feito no experimento discutido a seguir. No item 4.3.2.15. foi avaliada a estabilidade da solução estreptavidina-peroxidase pronta para uso, aplicando 5 diferentes diluentes. O uso de solução diluente constituída por 25% do estabilizador BioStab Antibody Stabilizer + 75% da **Solução 7**, conferiu boa estabilidade ao reagente, uma vez que a variação percentual média foi igual a 8,79%, resultado satisfatório considerando a faixa sugerida pelo *Food and Drug Association* (FDA, 2018). Assim, a solução estreptavidina-peroxidase pronta para uso apresenta uma boa estabilidade, podendo ser armazenada por 1,09 anos à temperatura média de 5°C (2-8°C).

Por fim, foi realizado o ensaio para determinação da curva de calibração utilizando o protocolo com as alterações estabelecidas ao longo do desenvolvimento do trabalho. No entanto, o sistema diagnóstico demonstrou uma baixa sensibilidade e foram necessárias alterações para seu aperfeiçoamento. Diversas alterações no protocolo foram realizadas, tendo sido observada a necessidade de retornar à utilização do tampão fosfato na etapa de sensibilização, o que impactou positivamente a sensibilidade do teste. O uso do tampão fosfato se justifica pelo seu pH levemente básico e próximo ao do sangue (7,2-7,4), que favorece a estabilidade do anticorpo de captura. Por outro lado, o tampão carbonato apresenta pH consideravelmente básico, aproximadamente 9, dessa forma, um pH extremo pode contribuir para uma forte repulsão eletrostática intramolecular que resulta em expansão e desdobramento, podendo gerar modificações físicas na conformação tridimensional do anticorpo de captura em solução e alterar sua capacidade de ligação específica ao PlGF (NELSON; COX; LEHNINGER, 2019).

Além disso, em conjunto com o uso do tampão fosfato na etapa de sensibilização foi reavaliada a incubação separada da amostra e anticorpo ligado à biotina, cada uma por 45 minutos à 37°C. A incubação conjunta anteriormente adotada pode ter alterado a sensibilidade do teste ELISA PlGF em decorrência do comprometimento da ligação antígeno-anticorpo. O anticorpo ligado à biotina é policlonal, ou seja, tem a capacidade de se ligar a diferentes epítomos do PlGF, portanto, a sua ligação a esta molécula na fase líquida é facilitada em relação a ligação do PlGF ao anticorpo de captura, que é monoclonal e, por isso se liga a apenas um epítipo do antígeno (MACEDO, 2018). Dessa forma, a ligação preferencial do PlGF ao anticorpo ligado à

biotina pode ter dificultado a ligação desta proteína ao anticorpo presente na fase sólida e interferido na sensibilidade do conjunto diagnóstico.

Por fim, foi realizada nova curva de calibração, aplicando o protocolo final estabelecido para o conjunto diagnóstico ELISA PlGF (**Figura 13**). O coeficiente de determinação (R^2) obtido foi igual a 0,9983, o que demonstra bom ajuste dos dados ao modelo proposto, pois quanto mais próximo o valor está de 1 melhor o ajuste ao modelo linear (CHEIN, 2019). É importante destacar a necessidade de determinar a concentração plasmática de PlGF nas gestantes do estudo ECLIPSE que desenvolveram PE e também nas que não desenvolveram PE para a completa validação da curva de calibração proposta.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo foram propostas formulações para os diferentes reagentes que compuseram o conjunto diagnóstico ELISA PlGF e foi avaliado o desempenho destas soluções. Entretanto, ainda é necessário propor ajustes de algumas soluções, quer seja para aumentar a estabilidade de uma formulação proposta (solução diluente do anticorpo ligado à biotina) ou para propor um diluente que contenha um conservante adequado para o sistema (diluente padrão). Os parâmetros de concentração e volume dos componentes do teste e as condições de incubação em cada uma das etapas foram avaliadas, o que permitiu a definição de um protocolo final para o sistema imunométrico ELISA PlGF.

No que se refere à estabilidade do conjunto diagnóstico desenvolvido, foi avaliada a estabilidade da fase sólida, do anticorpo ligado à biotina e da estreptavidina-HRP, sendo necessário ainda avaliar a estabilidade do substrato e da solução de parada. Foi proposta uma curva de calibração para o sistema, o que permite prever a sensibilidade analítica do mesmo. Testes mais específicos precisam ser realizados para a confirmação desta.

7. PERSPECTIVAS

É importante destacar a necessidade de determinar a concentração plasmática de PlGF nas gestantes do estudo ECLIPSE que desenvolveram PE e também nas que não desenvolveram PE para a completa validação da curva de calibração proposta para o sistema imunométrico ELISA PlGF. O conjunto diagnóstico proposto precisa ser submetido a um processo de validação que também contemple os testes de especificidade, precisão, interferência, tipos de anticoagulantes sanguíneos a serem empregados na amostra sanguínea, dentre outros. Assim, após a validação interna e externa do conjunto diagnóstico PlGF e sFlt-1 será possível estabelecer o valor de *cut off* da razão sFlt-1/PlGF, o que permitirá que os testes ELISA desenvolvidos sejam utilizados no auxílio ao diagnóstico de PE. Dessa forma, será possível ampliar o acesso a este exame laboratorial e sua implementação na rotina de pré-natal de gestantes no sistema de saúde brasileiro, o que contribuirá para decisões médicas mais assertivas e para otimização dos gastos públicos em saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALOS, E. *et al.* Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. **European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology**, v. 170, n. 1, p. 1-7, 2013.

ABDUL-FATTAH, A. M.; KALONIA, D. S.; PIKAL, M. J. The challenge of drying method selection for protein pharmaceuticals: product quality implications. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 96, n. 8, p. 1886-1916, 2007.

AGRAWAL, S. *et al.* Predictive performance of PlGF (placental growth factor) for screening preeclampsia in asymptomatic women: a systematic review and meta-analysis. **Hypertension**, v. 74, n. 5, p. 1124-1135, 2019.

AKSOYALP, Z. S.; ERDOĞAN, B. R.; AKSUN, S. Methods: Optimization of Enzyme-Linked Immunosorbent assay kit protocol to detect trimethylamine n-oxide levels in humans. **EXCLI Journal**, v. 22, p. 263-273, 2023.

ALEXANDER, B. T. *et al.* Reduced uterine perfusion pressure during pregnancy in the rat is associated with increases in arterial pressure and changes in renal nitric oxide. **Hypertension**, v. 37, n. 4, p. 1191-1195, 2001.

ALHAJJ, M.; ZUBAIR, M.; FARHANA, A. Enzyme linked immunosorbent assay. **StatPearls**, 2023.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS, ACOG. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. **Obstet. Gynecol.**, v. 122, p. 1122–31, 2013.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS, ACOG. Practice Bulletin no. 202: gestational hypertension and preeclampsia. **Obstet Gynecol**, v. 133, n. 1, p. e1-e25, 2019.

APTE, R. S.; CHEN, D. S.; FERRARA, N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development. **Cell**, v. 176, n. 6, p. 1248-1264, 2019.

AVRAMEAS, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde: use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. **Immunochemistry**, v. 6, n. 1, p. 43-52, 1969.

AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. **Peptides**, v. 72, p. 4-15, 2015.

BERGMANN, A. *et al.* Reduction of circulating soluble Flt-1 alleviates preeclampsia-like symptoms in a mouse model. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 6b, p. 1857-1867, 2010.

BOELDT, D. S.; BIRD, I. M. Vascular adaptation in pregnancy and endothelial dysfunction in preeclampsia. **The Journal of Endocrinology**, v. 232, n. 1, p. R27, 2017.

BROSENS, I. *et al.* The “Great Obstetrical Syndromes” are associated with disorders of deep placentation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 204, n. 3, p. 193-201, 2011.

BROSENS, I.; RENAER, M. On the pathogenesis of placental infarcts in pre-eclampsia. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 79, n. 9, p. 794-799, 1972.

BROWN, M. A. *et al.* Hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis, and management recommendations for international practice. **Hypertension**, v. 72, n. 1, p. 24-43, 2018.

BURTON, G. J. *et al.* Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. **Bmj**, v. 366, 2019.

BUTLER, J. E. Enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of immunoassay**, v. 21, n. 2-3, p. 165-209, 2000.

CARMELIET, P. *et al.* Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. **Nature Medicine**, v. 7, n. 5, p. 575-583, 2001.

CATT, K. ; TREGGAR, G. W. Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes. **Science**, v. 158, n. 3808, p. 1570-1572, 1967.

CHAEMSAITHONG, P.; SAHOTA, D. S.; POON, L.C. First trimester preeclampsia screening and prediction. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 226, n. 2, p. S1071-S1097, 2022.

CHAPPELL, L. C. *et al.* Diagnostic accuracy of placental growth factor in women with suspected preeclampsia: a prospective multicenter study. **Circulation**, v. 128, n. 19, p. 2121-2131, 2013.

CHEIN, F. Introdução aos modelos de regressão linear: um passo inicial para compreensão da econometria como uma ferramenta de avaliação de políticas públicas. **Brasília: Enap**, 2019.

CLAUSS, M. *et al.* The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities: implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 30, p. 17629-17634, 1996.

COONS, A. H.; CREECH, H. J.; JONES, R. Norman. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Proceedings of the society for experimental biology and medicine**, v. 47, n. 2, p. 200-202, 1941.

DAIBER, A.; CHLOPICKI, S. Revisiting pharmacology of oxidative stress and endothelial dysfunction in cardiovascular disease: Evidence for redox-based therapies. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 157, p. 15-37, 2020.

DAVEY, D. A.; MACGILLIVRAY, I. The classification and definition of the hypertensive disorders of pregnancy. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 158, n. 4, p. 892-898, 1988.

DE FALCO, S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 44, n. 1, p. 1-9, 2012.

DE WOLF, F.; ROBERTSON, W. B.; BROSENS, I. The ultrastructure of acute atherosclerosis in hypertensive pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 123, n. 2, p. 164-174, 1975.

DIAS, B.R *et al.* Avaliação da idade gestacional de recém-nascidos pré-termo através do exame neurológico e das escalas neonatais e obstétricas. **Arq Neuropsiquiatria**, v.63, p. 632-6, 2005.

DRÖGE, L. A. *et al.* Prediction of preeclampsia-related adverse outcomes with the sFlt-1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1)/PlGF (placental growth factor)-ratio in the clinical routine: a real-world study. **Hypertension**, v. 77, n. 2, p. 461-471, 2021.

DULEY, L. *et al.* Magnesium sulphate and other anticonvulsants for women with pre-eclampsia. **Cochrane database of systematic reviews**, n. 11, 2010.

DULEY, L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. **Seminars in Perinatology**. **WB Saunders**, p. 130-137, 2009.

EHRlich, L. *et al.* Increased placental sFlt-1 but unchanged PlGF expression in late-onset preeclampsia. **Hypertension in Pregnancy**, v. 36, n. 2, p. 175-185, 2017.

ENGvall, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871-874, 1971.

ESSER, S. *et al.* Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. **The Journal of cell biology**, v. 140, n. 4, p. 947-959, 1998.

FAN, X. *et al.* Endometrial VEGF induces placental sFLT1 and leads to pregnancy complications. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 11, p. 4941-4952, 2014.

FDA, U. S. *et al.* Bioanalytical method validation guidance for industry. **US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research and Center for Veterinary Medicine**, 2018.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA, FEBRASGO. Série, Orientações e recomendações: PE. **Editora connexomm. ed**, v. 8, 2017.

FERRARA, N.; ADAMIS, A. P. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 6, p. 385-403, 2016.

FERREIRA, E. T. M. *et al.* Características maternas e fatores de risco para PE em gestantes. **Rev Rene**, v. 20, 2019.

GILBERT, J. S.; BABCOCK, S. A.; GRANGER, J. P. Hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats is associated with increased soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression. **Hypertension**, v. 50, n. 6, p. 1142-1147, 2007.

GILLESPIE, S. L.; PORTER, K.; CHRISTIAN, L.M. Adaptation of the inflammatory immune response across pregnancy and postpartum in Black and White women. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 114, p. 27-31, 2016.

GONZÁLEZ-NAVARRO, P. *et al.* Preeclampsia, eclampsia and HELLP. **Revista mexicana de Anestesiología**, v. 38, n. S1, p. 118-127, 2015.

GU, W. *et al.* Effects of low-dose aspirin on the prevention of preeclampsia and pregnancy outcomes: A randomized controlled trial from Shanghai, China. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 248, p. 156-163, 2020.

HAYRAPETYAN, H. *et al.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications. **ELISA: Methods and Protocols**, p. 1-17, 2023.

HECHT, J. L. *et al.* The pathology of eclampsia: An autopsy series. **Hypertension in pregnancy**, v. 36, n. 3, p. 259-268, 2017.

HERRAIZ, I. *et al.* Update on the diagnosis and prognosis of preeclampsia with the aid of the sFlt-1/PlGF ratio in singleton pregnancies. **Fetal Diagnosis and Therapy**, v. 43, n. 2, p. 81-89, 2018.

HONG, K. *et al.* Defective uteroplacental vascular remodeling in preeclampsia: key molecular factors leading to long term cardiovascular disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 20, p. 11202, 2021.

HONG, K. *et al.* Defective uteroplacental vascular remodeling in preeclampsia: key molecular factors leading to long term cardiovascular disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 20, p. 11202, 2021.

HUCKLE, W. R.; ROCHE, R. I. Post-transcriptional control of expression of sFlt-1, an endogenous inhibitor of vascular endothelial growth factor. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 93, n. 1, p. 120-132, 2004.

HURRELL, A. *et al.* Placental growth factor in suspected preterm pre-eclampsia: a review of the evidence and practicalities of implementation. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 127, n. 13, p. 1590-1597, 2020.

IYER, S. *et al.* The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 15, p. 12153-12161, 2001.

JARDIM, L. L. *et al.* Is the imbalance between pro-angiogenic and anti-angiogenic factors associated with preeclampsia?. **Clinica Chimica Acta**, v. 447, p. 34-38, 2015.

JENA, M. K. *et al.* Pathogenesis of preeclampsia and therapeutic approaches targeting the placenta. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, p. 953, 2020.

JIM, B.; KARUMANCHI, S. A. Preeclampsia: pathogenesis, prevention, and long-term complications. **Seminars in Nephrology**, **WB Saunders**, p. 386-397, 2017.

JUNG, E. *et al.* The etiology of preeclampsia. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 226, n. 2, p. S844-S866, 2022.

KAHHALE, S.; FRANCISCO, R. P. V.; ZUGAIB, M.. Pré-eclâmpsia. **Revista de Medicina**, v. 97, n. 2, p. 226-234, 2018.

KATO, K. *et al.* Use of rabbit antibody IgG bound onto plain and aminoalkylsilyl glass surface for the enzyme-linked sandwich immunoassay. **The Journal of Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 261-266, 1977.

KENDALL, R. L.; WANG, G.; THOMAS, K. A. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 226, n. 2, p. 324-328, 1996.

KHAN, K. S. *et al.* WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. **The lancet**, v. 367, n. 9516, p. 1066-1074, 2006.

KHODZHAIEVA, Z. S. *et al.* Clinical and pathogenetic features of early and late-onset pre-eclampsia. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 29, n. 18, p. 1980-2986, 2016.

KIM, N. H. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble VEGF receptor FLT-1 in diabetic nephropathy. **Kidney International**, v. 67, n. 1, p. 167-177, 2005.

KIM, Y. W.; BYZOVA, T. V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. **Blood, the Journal of the American Society of Hematology**, v. 123, n. 5, p. 625-631, 2014.

KISAND, K. *et al.* Impact of cryopreservation on serum concentration of matrix metalloproteinases (MMP)-7, TIMP-1, vascular growth factors (VEGF) and VEGF-R2 in Biobank samples. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v. 49, n. 2, p. 229-235, 2011.

KOHL, T. O.; ASCOLI, C. A. Direct and Indirect Cell-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Cold spring harbor protocols**, v. 2017, n. 5, 2017.

KONSTANTINOOU, G. N. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Food Allergens: Methods and Protocols**, p. 79-94, 2017.

KOTROTSIOU, E. *et al.* How do patients experience stress caused by hospitalisation and how do nurses perceive this stress experienced by patients? A comparative study. **ICU Nursing Web Journal**, 2001.

LAMARCA, B.; BREWER, J.; WALLACE, K. IL-6-induced pathophysiology during pre-eclampsia: potential therapeutic role for magnesium sulfate?. **International Journal of interferon, cytokine and mediator research**, p. 59-64, 2011.

LAMBERT, G. *et al.* Preeclampsia: an update. **Acta Anaesthesiol Belg**, v. 65, n. 4, p. 137-49, 2014.

LEAL, C. R. V. *et al.* Renin-angiotensin system in normal pregnancy and in preeclampsia: A comprehensive review. **Pregnancy hypertension**, v. 28, p. 15-20, 2022.

LEAÑOS-MIRANDA, A. *et al.* Circulating angiogenic factors are related to the severity of gestational hypertension and preeclampsia, and their adverse outcomes. **Medicine**, v. 96, n. 4, 2017.

LECARPENTIER, E.; TSATSARIS, V. Angiogenic balance (sFlt-1/PlGF) and preeclampsia. **Annales d'endocrinologie, Elsevier Masson**, p. 97-100, 2016.

LEUNG, D. W. *et al.* Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**, v. 246, n. 4935, p. 1306-1309, 1989.

LIBBY, P. Interleukin-1 beta as a target for atherosclerosis therapy: biological basis of CANTOS and beyond. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 18, p. 2278-2289, 2017.

LIJNEN, H. R. *et al.* Impaired adipose tissue development in mice with inactivation of placental growth factor function. **Diabetes**, v. 55, n. 10, p. 2698-2704, 2006.

LINDSTRÖM, P.; WAGER, O. IgG autoantibody to human serum albumin studied by the ELISA-technique. **Scandinavian journal of immunology**, v. 7, n. 5, p. 419-425, 1978.

MA'AYEH, M.; COSTANTINE, M. M. Prevention of preeclampsia. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, v. 25, n. 5, 2020.

MACDONALD, T. M. *et al.* Clinical tools and biomarkers to predict preeclampsia. *EBioMedicine*, v. 75, p. 103780, 2022.

MACEDO, M. J. P. B. Estratégias e inovações aplicadas ao desenvolvimento de anticorpos monoclonais. Tese de Doutorado. **Universidade de São Paulo**, 2018.

MAGEE, L. A. *et al.* Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy. **Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health**, v. 4, n. 2, p. 105-145, 2014.

MAGEE, L. A. *et al.* The CHIPS randomized controlled trial (Control of Hypertension in Pregnancy Study) is severe hypertension just an elevated blood pressure?. **Hypertension**, v. 68, n. 5, p. 1153-1159, 2016.

MAGLIONE, D. *et al.* Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. **Oncogene**, v. 8, n. 4, p. 925-931, 1993.

MAIA, M. Q. *et al.* Desenvolvimento de Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para determinação plasmática de tirosina quinase tipo 1 solúvel semelhante à FMS (sFlt-1) em gestantes com alto risco para desenvolver pré-eclâmpsia, 2023.

MARCH, M. I. *et al.* Circulating angiogenic factors and the risk of adverse outcomes among Haitian women with preeclampsia. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0126815, 2015.

MAYNARD, S. E. *et al.* Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 5, p. 649-658, 2003.

MCLAUGHLIN, K. *et al.* Phenotypes of pregnant women who subsequently develop hypertension in pregnancy. **Journal of the American Heart Association**, v. 7, n. 14, p. e009595, 2018.

MENSINK, M. A. *et al.* How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 114, p. 288-295, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sistema de Informações sobre Mortalidade**. SIM, 2011. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br/tabnet/tabnet.htm>. Acesso em: 21 de setembro de 2022.

MORENO-EUTIMIO, M. A. *et al.* Increased serum levels of inflammatory mediators and low frequency of regulatory T cells in the peripheral blood of preeclamptic Mexican women. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

MOTTA, Valter T. Bioquímica básica. **Introdução à bioquímica. Capítulo**, v. 1, 2011.

MOURA, M. D. R. *et al.* Hipertensão Arterial na Gestação-importância do seguimento materno no desfecho neonatal. **Comun. ciênc. saúde**, p. 113-120, 2011.

MYATT, L; CUI, X. Oxidative stress in the placenta. **Histochemistry and cell biology**, v. 122, n. 4, p. 369-382, 2004.

NADERI, S.; TSAI, S. A.; KHANDELWAL, A. Hypertensive disorders of pregnancy. **Current atherosclerosis reports**, v. 19, p. 1-6, 2017.

NELSON, David L.; COX, Michael M.; LEHNINGER, Albert L. **Lehninger: princípios de bioquímica**. Omega, 2019.

NOVOTNY, S. R. *et al.* Activating autoantibodies to the angiotensin II type I receptor play an important role in mediating hypertension in response to adoptive transfer of CD4+ T lymphocytes from placental ischemic rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n. 10, p. R1197-R1201, 2012.

O'GORMAN, N. *et al.* Multicenter screening for pre-eclampsia by maternal factors and biomarkers at 11–13 weeks' gestation: comparison with NICE guidelines and ACOG recommendations. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 49, n. 6, p. 756-760, 2017.

OLIVEIRA, C. A. *et al.* Síndromes hipertensivas da gestação e repercussões perinatais. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 6, p. 93-98, 2006.

OLIVEIRA, L. G.; KARUMANCHI, A.; SASS, N. PE: estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, p. 609-616, 2010.

PAGE, E. W.; VILLEE, C. A.; VILLEE, D. B. Human reproduction: the core content of obstetrics, gynecology, and perinatal medicine. **(No Title)**, 1972.

PAHLAVANI, H. A. *et al.* Physical exercise for a healthy pregnancy: the role of placentokines and exerkins. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 73, n. 1, p. 30, 2023.

PALMER, K. R.; TONG, S.; KAITU'U-LINO, T. J. Placental-specific sFLT-1: role in pre-eclamptic pathophysiology and its translational possibilities for clinical prediction and diagnosis. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 23, n. 2, p. 69-78, 2017.

PERAÇOLI, J.C. *et al.* Pré-eclampsia – Protocolo 2023. **Rede Brasileira de Estudos sobre Hipertensão na Gravidez (RBEHG)**, 2023.

POWE, C. E. *et al.* Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. **Circulation**, v. 123, n. 24, p. 2856-2869, 2011.

QING, X. *et al.* Targeted inhibition of complement activation prevents features of preeclampsia in mice. **Kidney International**, v. 79, n. 3, p. 331-339, 2011.

RAMOS, J. G. L.; SASS, N.; COSTA, S. H. M. Preeclampsia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, n. 39, p. 496-512, 2017.

RANA, S. *et al.* Angiogenic factors and the risk of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. **Circulation**, v. 125, n. 7, p. 911-919, 2012.

RANA, S. *et al.* Preeclampsia: pathophysiology, challenges, and perspectives. **Circulation research**, v. 124, n. 7, p. 1094-1112, 2019.

REDMAN, C. W. G.; SARGENT, I. L. Circulating microparticles in normal pregnancy and preeclampsia. **Placenta**, v. 29, p. 73-77, 2008.

REDMAN, C. W. G.; STAFF, A. C.; ROBERTS, J. M. Syncytiotrophoblast stress in preeclampsia: the convergence point for multiple pathways. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 226, n. 2, p. S907-S927, 2022.

RIEBER-MOHN, A. B. *et al.* Auto-antibodies against the angiotensin II type I receptor in women with uteroplacental acute atherosclerosis and preeclampsia at delivery and several years postpartum. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 128, p. 23-29, 2018.

ROBERTS, J. M. *et al.* Preeclampsia: an endothelial cell disorder. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 161, n. 5, p. 1200-1204, 1989.

ROBERTS, J. M.; GAMMILL, H. S. Preeclampsia: recent insights. **Hypertension**, v. 46, n. 6, p. 1243-1249, 2005.

ROBERTS, J. M.; RAJAKUMAR, A. Preeclampsia and soluble fms-like tyrosine kinase 1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 7, p. 2252-2254, 2009.

ROLNIK, D. L. *et al.* Aspirin versus placebo in pregnancies at high risk for preterm preeclampsia. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 7, p. 613-622, 2017.

RYAN, D. H. *et al.* Placental growth factor: A review of literature and future applications. **Pregnancy Hypertension**, v. 14, p. 260-264, 2018.

SAFFER, C. *et al.* Determination of placental growth factor (PlGF) levels in healthy pregnant women without signs or symptoms of preeclampsia. **Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health**, v. 3, n. 2, p. 124-132, 2013.

SAHAY, A. S. *et al.* VEGF and VEGFR1 levels in different regions of the normal and preeclampsia placentae. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 438, p. 141-152, 2018.

SALAHUDDIN, S. *et al.* KRYPTOR-automated angiogenic factor assays and risk of preeclampsia-related adverse outcomes. **Hypertension in pregnancy**, v. 35, n. 3, p. 330-345, 2016.

SCHETTER, C. D.; TANNER, L. Anxiety, depression and stress in pregnancy: implications for mothers, children, research, and practice. **Current opinion in psychiatry**, v. 25, n. 2, p. 141, 2012.

SEBASTIÃO, M. M. *et al.* Análise de impacto orçamentário do uso da razão dos testes sFlt-1: PlGF na exclusão de PE em mulheres com suspeita clínica na perspectiva do sistema de saúde suplementar. **J. bras. econ. saúde (Impr.)**, p. 244-254, 2019.

SHAH, D. A.; KHALIL, R. A. Bioactive factors in uteroplacental and systemic circulation link placental ischemia to generalized vascular dysfunction in hypertensive pregnancy and preeclampsia. **Biochemical Pharmacology**, v. 95, n. 4, p. 211-226, 2015.

SHAH, K.; MAGHSOUDLOU, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. **British journal of hospital medicine**, v. 77, n. 7, p. C98-C101, 2016

SHERRELL, H. *et al.* Systematic review of maternal Placental Growth Factor levels in late pregnancy as a predictor of adverse intrapartum and perinatal outcomes. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 225, p. 26-34, 2018.

SORICE, R. *et al.* Genetic and environmental factors influencing the placental growth factor (PGF) variation in two populations. **Journal Plos One**, 2012.

SOVIO, U. *et al.* Prediction of preeclampsia using the soluble fms-like tyrosine kinase 1 to placental growth factor ratio: a prospective cohort study of unselected nulliparous women. **Hypertension**, v. 69, n. 4, p. 731-738, 2017.

STULZER, H. K.; SILVA, M. A. S. Estudo de estabilidade de grânulos revestidos e comprimidos contendo captopril. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 497, 2007.

TAN, M. Y. *et al.* Screening for pre-eclampsia by maternal factors and biomarkers at 11–13 weeks' gestation. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 52, n. 2, p. 186-195, 2018.

TANNETTA, D. *et al.* Update of syncytiotrophoblast derived extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia. **Journal of reproductive immunology**, v. 119, p. 98-106, 2017.

TEIXEIRA, P. G. Avaliação do valor preditivo do PLGF e sFlt-1 e do doppler das artérias uterinas no rastreamento da pré-eclâmpsia. 2011.

TEIXEIRA, P. G. Fatores de angiogênese na PE e a correlação com os níveis da pressão arterial média. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, p. 329-329, 2007.

VAN BERGEN, T. *et al.* The role of placental growth factor (PLGF) and its receptor system in retinal vascular diseases. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 69, p. 116-136, 2019.

VAUGHAN, J. E.; WALSH, S. W. Oxidative stress reproduces placental abnormalities of preeclampsia. **Hypertension in pregnancy**, v. 21, n. 3, p. 205-223, 2002.

VERLOHREN, S. *et al.* Clinical interpretation and implementation of the sFlt-1/PLGF ratio in the prediction, diagnosis and management of preeclampsia. **Pregnancy Hypertension**, v. 27, p. 42-50, 2022.

VISINTIN, C. *et al.* Management of hypertensive disorders during pregnancy: summary of NICE guidance. **Bmj**, v. 341, 2010.

VUORELA, P. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor in peripheral blood cells of preeclamptic women. **Hypertension in Pregnancy**, v. 22, n. 2, p. 193-201, 2003.

WANG, Z.; FENG, W.; LIU, J. Current understanding of autoantibody against angiotensin ii type 1 receptor in preeclampsia. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 35, n. 21, p. 4089-4094, 2022.

WILLIAMS, P. J.; PIPKIN, F. B. The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 25, n. 4, p. 405-417, 2011.

WILLIAMSON, R. D. *et al.* Oxidative stress in pre-eclampsia; have we been looking in the wrong place?. **Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health**, v. 8, p. 1-5, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* WHO recommendations for prevention and treatment of pre-eclampsia and eclampsia. 2011.

WU, C. S. *et al.* Health of children born to mothers who had preeclampsia: a population-based cohort study. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 201, n. 3, p. 269. e1-269. e10, 2009.

XU, S. *et al.* Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: from mechanism to pharmacotherapies. **Pharmacological Reviews**, v. 73, n. 3, p. 924-967, 2021.

YOO, S.A. *et al.* Role of placenta growth factor and its receptor flt-1 in rheumatoid inflammation: a link between angiogenesis and inflammation. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 60, n. 2, p. 345-354, 2009.

YOUNG, J. The Etiology of Eclampsia and Albuminuria and Their Relation to Accidental Hæmorrhage. **Transactions. Edinburgh Obstetrical Society**, v. 39, p. 153-202, 1914.

ZEISLER, H. *et al.* Predictive value of the sFlt-1: PlGF ratio in women with suspected preeclampsia. **N Engl J Med**, v. 374, p. 13-22, 2016.

APÊNDICE A

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização genética, imunológica, hemostática, bioquímica e angiogênica das gestantes com fatores de risco e/ou com pré-eclâmpsia atendidas nos Centros de Saúde do Distrito Oeste e na Maternidade Odete Valadares em Belo Horizonte/MG

Pesquisador: Patrícia Nessralla Alpoim

Área Temática:

Versão: 7

CAAE: 12471918.0.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.516.488

Apresentação do Projeto:

A emenda refere-se à resposta ao parecer 6.336.604 de 01 de outubro de 2023 vinculada ao projeto de pesquisa "Caracterização genética, imunológica, hemostática, bioquímica e angiogênica das gestantes com fatores de risco e/ou com pré-eclâmpsia atendidas nos Centros de Saúde do Distrito Oeste e na Maternidade Odete Valadares em Belo Horizonte/MG" em que foram solicitadas recomendações para inclusão de documentos e acerto dos TALE e TCLE. Os pesquisadores encaminharam uma carta "ementa.docx" constando as alterações realizadas, são elas: inserção na plataforma de todos os roteiros de entrevista da pesquisa em questão e descrito no TCLE e TALE o tempo estimado para responder os questionários, bem como inserido espaço para rubrica no TCLE e TALE, numeração das páginas e adequação da linguagem dos mesmos

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com os pesquisadores, o objetivo primário é caracterizar o perfil genético, imunológico, hemostático, bioquímico e angiogênico ao longo da gestação de gestantes com ou sem fatores de risco para a PE e acompanhar o seu desfecho clínico (estudo longitudinal), bem como nas gestantes normotensas e com diagnóstico estabelecido de PE

após a 20ª semana de gestação (estudo transversal), atendidas nos centros de saúde do Distrito

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar Sala 2005 Campus Pampulha

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coop@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 6.516.488

Oeste e na Maternidade Odete Valadares em Belo Horizonte e nas Unidades de Saúde e serviço de Pré-Natal de Alto Risco (PNAR), ambos no Município de Divinópolis/MG. Como objetivos secundários, os autores informam que em ambos os estudos (longitudinal e transversal), pretende-se: Avaliar nas células do sangue das gestantes: polimorfismos e mutações de genes responsáveis pela síntese de: mediadores inflamatórios, enzimas relacionadas direta ou indiretamente à via do óxido nítrico e de genes envolvidos na hemostasia e coagulação; Determinar os níveis no sangue periférico materno, bem como no sangue de cordão umbilical e na placenta (após o parto) de citocinas pró-inflamatórias, de proteínas envolvidas no processo de resolução da inflamação, de fatores neurotróficos, de marcadores da coagulação, fibrinólise e lesão endotelial, dos anticoagulantes naturais e marcadores da angiogênese. Pretendem também: Determinar os níveis de marcadores de função hepática, função renal, estresse oxidativo, Dimetil Arginina Assimétrica (ADMA), Guanosina3', 5'-cíclica monofosfato (GMP) cíclico, ácido úrico e glicose; Determinar o número de plaquetas circulantes e dos novos parâmetros plaquetários e os agregados plaquetas-leucócitos (PMA, PNA); Determinar o número de micropartículas plasmáticas circulantes (endoteliais, leucocitárias, plaquetárias, eritrocíticas e trofoblásticas); Identificar microRNAs plasmáticos e placentários reguladores de expressão de genes envolvidos na placentação; Investigar se os microRNAs são carregados pelas micropartículas plasmáticas; Investigar o grupo sanguíneo ABO; Desenvolver um teste Point-of-care (POCT) para determinação dos níveis plasmáticos de sFlt-1 e PIGF nas gestantes com histórico pessoal ou familiar de PE e outros fatores de risco para a doença. Para o estudo longitudinal, primeiramente serão comparados os níveis plasmáticos destes marcadores em cada período gestacional nas gestantes de forma individual. Em seguida, será feita uma comparação dos níveis plasmáticos destes marcadores entre as gestantes que desenvolveram e aquelas que não desenvolveram PE, nos períodos gestacionais avaliados. Essas análises permitirão: Determinar os valores de referência destes marcadores na população como preditivos da PE; Determinar os valores de referência destes marcadores na população para o diagnóstico diferencial da PE precoce e da PE tardia; Elaborar um fluxograma de atendimento às gestantes portadoras de fatores de risco para PE em atendimento pelo SUS. Também serão feitas análises de correlação entre os níveis desses marcadores no sangue periférico e de cordão umbilical e a sua expressão na placenta em ambos os estudos (longitudinal e transversal), bem como análises de correlações entre os níveis dos marcadores (sangue periférico, sangue de cordão umbilical e placenta) e as características clínicas e parâmetros laboratoriais das pacientes.

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar Sala 2005 Campus Pampulha

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Página 02 de 06

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 6.516.488

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores informam que os riscos são na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. O sangue será coletado em três tipos de tubos e um pequeno

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**

Continuação do Parecer: 6.516.488

e técnicos de laboratório; 10. Divulgar o conhecimento adquirido sobre PE, por meio de publicações em revistas especializadas e apresentações em Congressos da área; 11. Divulgar os resultados obtidos por meio de publicação de artigos científicos em revistas estrangeiras e nacionais e de apresentações em Congressos Nacionais e Internacionais

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores incluíram os documentos listados abaixo para complementar a pesquisa e apresentaram adequações naqueles que estavam necessitando.

PUERPERIO.docx

ROTEIROLINHADEBASE.docx

ROTEIROONDAIII.docx

ROTEIROONDAII.docx

ONDAI.docx

FORMULARIODEELEGIBILIDADE.docx

FICHADEACOMPANHAMENTODA.docx

COLETADE DADOS POSPARTO.docx

TCLE.docx

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ao verificar a presença dos termos apresentados e atualizados no projeto de pesquisa original, estes não foram encontrados. Existe a necessidade de atualização do projeto com os referidos termos.

Recomendações:

Recomenda-se a atualização do projeto com os termos dos documentos encaminhados

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

SMJ, sou a favor da aprovação desta emenda.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar Sala 2005 Campus Pampulha**Bairro:** Unidade Administrativa II**CEP:** 31.270-901**UF:** MG**Município:** BELO HORIZONTE**Telefone:** (31)3409-4592**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 6.516.488

pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2189409_E3.pdf	09/10/2023 10:57:41		Aceito
Outros	PUERPERIO.docx	09/10/2023 10:52:44	Patrícia Nessralla Alpoim	Aceito
Outros	ROTEIROLINHADEBASE.docx	09/10/2023 10:52:18	Patrícia Nessralla Alpoim	Aceito
Outros	ROTEIROONDAll.docx	09/10/2023 10:51:36	Patrícia Nessralla Alpoim	Aceito
Outros	ROTEIROONDAll.docx	09/10/2023 10:51:15	Patrícia Nessralla Alpoim	Aceito
Outros	ONDAl.docx	09/10/2023 10:50:43	Patrícia Nessralla Alpoim	Aceito
Outros	FORMULARIODEELEGIBILIDADE.docx	09/10/2023 10:37:54	Patrícia Nessralla Alpoim	Aceito
Outros	FICHADEACOMPANHAMENTODA.docx	09/10/2023 10:36:25	Patrícia Nessralla Alpoim	Aceito
Outros	COLETADEADOSPOSPARTO.docx	09/10/2023 10:20:48	Patrícia Nessralla Alpoim	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	09/10/2023 10:20:16	Patrícia Nessralla Alpoim	Aceito
Outros	ementa.docx	09/10/2023 10:19:22	Patrícia Nessralla Alpoim	Aceito
Outros	CartaaceiteSEMUSA.pdf	05/05/2023 17:44:11	Patrícia Nessralla Alpoim	Aceito
Outros	CARTAAutorizacaosaojoaodedeus.pdf	05/05/2023 17:43:19	Patrícia Nessralla Alpoim	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoFINALUFSJ.pdf	05/05/2023 17:41:47	Patrícia Nessralla Alpoim	Aceito
Outros	4_Declaracao_infraestrutura_CCO_UFS_Jassinadoassinado.pdf	05/05/2023 17:37:58	Patrícia Nessralla Alpoim	Aceito
Outros	Carta_COEP_29_06_19.pdf	29/06/2019 09:12:34	Luiza Oliveira Perucci	Aceito
Outros	Parecer_camara_departamental.pdf	15/04/2019 14:15:32	Luiza Oliveira Perucci	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico /	Biorrepositorio.pdf	15/04/2019 14:14:54	Luiza Oliveira Perucci	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar Sala 2005 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 6.516.488

Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	15/04/2019 14:14:54	Luiza Oliveira Perucci	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	13/11/2018 15:47:15	Patrícia Nessralla Alpoim	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_COEP_Plataforma_Bra sil.pdf	13/11/2018 15:41:18	Patrícia Nessralla Alpoim	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 21 de Novembro de 2023

Assinado por:
Corinne Davis Rodrigues
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar Sala 2005 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(gestantes maiores de 18
anos)

A Sra. está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa "Caracterização genética, imunológica, hemostática, bioquímica e angiogênica das gestantes com fatores de risco e/ou com pré-eclâmpsia atendidas nos Centros de Saúde do Distrito Oeste e na Maternidade Odete Valadares em Belo Horizonte/MG".

Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e o descarte dos seguintes materiais humanos: sangue periférico materno, sangue de cordão umbilical, fragmentos de placenta e urina. A utilização do seu material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa, mas, se a Sra. concordar, em outros futuros. Nesta pesquisa serão realizados, ao longo da gestação ou no momento do parto, alguns exames que avaliam a coagulação do sangue, a inflamação, a formação de novos vasos sanguíneos e exames genéticos.

Para esta pesquisa, adotaremos os seguintes procedimentos: coleta de um volume total de 20mL do seu sangue (cinco tubinhos) e 15mL de urina em quatro momentos da gestação (semanas 12 a 19, 20 a 29, 30 a 34 e 35 a 40 ou após o diagnóstico de pré-eclâmpsia). Após o parto, o corte do cordão umbilical e a expulsão da placenta, serão coletados dois fragmentos da placenta e dois tubinhos de sangue do cordão. As amostras serão processadas e mantidas em freezer a -80°C e o restante será descartado seguindo a legislação. Na coleta de sangue materno pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Pode ocorrer um pequeno desconforto na troca dos tubos. Para minimizar esse desconforto e a formação de hematomas, a coleta será realizada por um profissional experiente. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis, de forma que não há risco de contaminação. Após a coleta, será feita a compressão local para garantir o estancamento do sangramento. Caso a Sra. esteja usando anticoagulante, essa compressão será feita pelo tempo que for necessário e não será realizada nova coleta de sangue. A coleta do sangue de cordão umbilical e dos fragmentos de placenta não oferece nenhum risco a Sra. e ao seu bebê, pois são estruturas que normalmente são descartadas após o parto.

Os resultados dessa pesquisa poderão contribuir para o melhor entendimento da pré-eclâmpsia e para que as gestantes que apresentam risco de desenvolver a doença sejam identificadas precocemente.

Para participar deste estudo, a Sra. não terá nenhum custo, uma vez que as coletas serão feitas quando a Sra. vier fazer a consulta do seu acompanhamento pré-natal, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, a Sra. tem assegurado o direito à indenização. A Sra. terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para recusar-se a participar a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, podendo retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que a Sra. é atendida pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. A Sra. não será identificada em nenhuma publicação resultante dessa pesquisa. Os resultados obtidos, quando essa pesquisa for finalizada, serão entregues ao seu obstetra e estarão à sua disposição.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica da participante: _____

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, na Faculdade de Farmácia/UFGM e a outra será fornecida a Sra. Os documentos e os materiais biológicos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável até a finalização do projeto na sala 4104, Bloco 3, 3º andar, da Faculdade de Farmácia da UFGM e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos. Os pesquisadores responsáveis se comprometem a cumprir integralmente o que está descrito neste termo e a esclarecer qualquer dúvida que possa surgir. Se a Sra. estiver de acordo, por favor, assine este termo.

Eu, _____, portadora do documento de Identidade _____ fui informada dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa "Caracterização genética, imunológica, hemostática, bioquímica e angiogênica das gestantes com fatores de risco e/ou com pré-eclâmpsia atendidas nos Centros de Saúde do Distrito Oeste e na Maternidade Odete Valadares em Belo Horizonte/MG", de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

() Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

() Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisas, mas serei comunicada pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome completo da participante

Data

Assinatura da participante

Nome completo do Pesquisador Responsável: Dra. Patrícia Nessralla Alpoim

Endereço: Faculdade de Farmácia-UFGM, Bloco 3, Sala 4108. Av. Antônio Carlos, 6627. CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG

Telefone: (31) 3409-7492

E-mail: patnessralla@yahoo.com.br

Assinatura do pesquisador responsável

Patric

ia

Nessr

Alpoim: 07114820631

31

Assinado de
forma digital

por Patrícia
Nessralla

Dados:

11.11.18

13:48:00

-03'00"

D

a

t

a

Nome completo do
 Pesquisador: Endereço:
 CEP: / Belo Horizonte – MG
 Telefones: (31)
 E-mail:

Assinatura do pesquisador (Membro da equipe de pesquisa)	Data
--	------

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, a Sra. poderá consultar:

COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II. 2º andar - Sala 2005.
 Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG - Brasil. CEP: 31270-901.
 E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

Comissão de Ética da FHEMIG
 Cidade Administrativa de Minas Gerais
 Rodovia Papa João Paulo II, 3777. Edifício Gerais - 13º andar.
 Bairro Serra Verde. Belo Horizonte, MG - Brasil. CEP: 31630-901
 E-mail: adc.etica@fhemig.mg.gov.br. Tel: 3915-9500.

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP-SMSA/BH)
 Rua Frederico Bracher Junior, 103. 3º andar/sala 2.
 Bairro Padre Eustáquio. Belo Horizonte, MG - Brasil. CEP: 30720-000
 E-mail: coep@pbh.gov.br. Tel: 3277-5309.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(representantes legais das gestantes menores de 18 anos)

A gestante sob sua responsabilidade está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa "Caracterização genética, imunológica, hemostática, bioquímica e angiogênica das gestantes com fatores de risco e/ou com pré-eclâmpsia atendidas nos Centros de Saúde do Distrito Oeste e na Maternidade Odete Valadares em Belo Horizonte/MG".

Se concordar com a participação da gestante, pedimos a sua autorização para a coleta, o armazenamento, a utilização e descarte dos seguintes materiais biológicos: sangue materno, sangue de cordão umbilical, fragmentos de placenta e urina. A utilização do material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa, mas, se o (a) Sr. (a) concordar, poderá ser utilizado em outros projetos futuros que acrescentarão novas análises nestas mesmas amostras. Nesta pesquisa serão realizados, ao longo da gestação ou no momento do parto, alguns exames que avaliam a coagulação do sangue, a inflamação, a formação de novos vasos sanguíneos e exames genéticos.

Para esta pesquisa, adotaremos os seguintes procedimentos: coleta de um volume total de 20mL de sangue (cinco tubinhos) e 15mL de urina em quatro momentos da gestação (semanas 12 a 19, 20 a 29, 30 a 34 e 35 a 40 ou após o diagnóstico de pré-eclâmpsia). Após o parto, o corte do cordão umbilical e a expulsão da placenta, serão coletados dois fragmentos da placenta e dois tubinhos de sangue do cordão. As amostras serão processadas e mantidas em freezer a -80°C e o restante será descartado seguindo a legislação. Na coleta de sangue materno pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar esse desconforto e a formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis, de forma que não há risco de contaminação. Após a coleta, será feita a compressão local para garantir o estancamento do sangramento. Caso a gestante esteja usando anticoagulante, essa compressão será feita pelo tempo que for necessário. Não será realizada nova coleta de sangue. A coleta do sangue de cordão umbilical e dos fragmentos de placenta não oferece nenhum risco à gestante e ao seu bebê, pois são estruturas que normalmente são descartadas após o parto.

Os resultados dessa pesquisa poderão contribuir para o melhor entendimento da pré-eclâmpsia e para que as gestantes que apresentam risco de desenvolver a doença sejam identificadas precocemente.

Para participar deste estudo, o (a) Sr. (a) ou a gestante não terão nenhum custo, uma vez que a coleta do sangue será feita quando a gestante vier fazer a consulta do seu acompanhamento pré-natal, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, a gestante tem assegurado o direito à indenização. O (a) Sr. (a) e a gestante terão o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejarem e estarão livres para participar ou recusar-se a participar a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, podendo retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A participação da gestante é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que ela é atendida pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. O nome dela ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (a) Sr. (a) ou a gestante não serão identificados(as) em nenhuma publicação resultante dessa pesquisa. Os resultados obtidos, quando essa pesquisa for finalizada, serão entregues ao obstetra da gestante e estarão à sua disposição.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do (a) representante legal: _____

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, na Faculdade de Farmácia/UFGM e a outra será fornecida ao (a) Sr. (a). Os documentos e os materiais biológicos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável até a finalização do projeto na sala 4104, Bloco 3, 3º andar, da Faculdade de Farmácia da UFGM e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade e a da gestante com padrões profissionais de sigilo, atendendo à legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos. Caso o Sr. (a) concorde que a gestante participe desta pesquisa, ela deverá assinar também o termo de assentimento livre e esclarecido. Os pesquisadores responsáveis se comprometem a cumprir integralmente o que está descrito neste termo e a esclarecer qualquer dúvida que possa surgir. Se o (a) Sr. (a) estiver de acordo, por favor, assine este termo.

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa “Caracterização genética, imunológica, hemostática, bioquímica e angiogênica das gestantes com fatores de risco e/ou com pré-eclâmpsia atendidas nos Centros de Saúde do Distrito Oeste e na Maternidade Odete Valadares em Belo Horizonte/MG”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

() Concordo que o material biológico da gestante sob minha responsabilidade seja utilizado somente para esta pesquisa.

() Concordo que o material biológico da gestante sob minha responsabilidade possa ser utilizado em outras pesquisas, mas serei comunicado (a) pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Declaro que concordo que a gestante sob minha responsabilidade participe desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome completo do (a) representante legal

Data

Assinatura do (a) representante legal

Nome completo do Pesquisador Responsável: Dra. Patrícia Nessralla Alpoim

Endereço: Faculdade de Farmácia-UFGM, Bloco 3, Sala 4108. Av. Antônio Carlos, 6627. CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG

Telefone: (31) 3409-7492

E-mail: patnessralla@yahoo.com.br

Assinatura do pesquisador responsável

Patrícia Nessralla Alpoim: 07114820631
Alpoim: 07114820631

Assinado de forma digital por Patrícia Nessralla Alpoim

Dados:
2021.11.18
13:49:02 -03'00'

Nome completo do
Pesquisador: Endereço:
CEP: / Belo Horizonte – MG
Telefones: (31)
E-mail:

Assinatura do pesquisador (Membro da equipe de pesquisa)	Data
--	------

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, o (a) Sr. (a) poderá

consultar:

COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II. 2º andar - Sala 2005.
Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG - Brasil. CEP: 31270-901.
E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

Comissão de Ética da FHEMIG
Cidade Administrativa de Minas Gerais
Rodovia Papa João Paulo II, 3777. Edifício Gerais - 13º andar.
Bairro Serra Verde. Belo Horizonte, MG - Brasil. CEP: 31630-901
E-mail: adc.etica@fhemig.mg.gov.br. Tel: 3915-9500.

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP-SMSA/BH)
Rua Frederico Bracher Junior, 103. 3º andar/sala 2.
Bairro Padre Eustáquio. Belo Horizonte, MG - Brasil. CEP: 30720-000
E-mail: coep@pbh.gov.br. Tel: 3277-5309.

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(gestantes menores de 18 anos)

Você está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa “Caracterização genética, imunológica, hemostática, bioquímica e angiogênica das gestantes com fatores de risco e/ou com pré-eclâmpsia atendidas nos Centros de Saúde do Distrito Oeste e na Maternidade Odete Valadares em Belo Horizonte/MG”.

Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e o descarte dos seguintes materiais humanos: sangue periférico materno, sangue de cordão umbilical, fragmentos de placenta e urina. A utilização do seu material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa, mas, se você concordar, em outros futuros. Nesta pesquisa serão realizados, ao longo da gestação ou no momento do parto, alguns exames que avaliam a coagulação do sangue, a inflamação, a formação de novos vasos sanguíneos e exames genéticos.

Para esta pesquisa, adotaremos os seguintes procedimentos: coleta de um volume total de 20mL do seu sangue (cinco tubinhos) e 15mL de urina em quatro momentos da gestação (semanas 12 a 19, 20 a 29, 30 a 34 e 35 a 40 ou após o diagnóstico de pré-eclâmpsia). Após o parto, o corte do cordão umbilical e a expulsão da placenta, serão coletados dois fragmentos da placenta e dois tubinhos de sangue do cordão. As amostras serão processadas e mantidas em freezer a -80°C e o restante será descartado seguindo a legislação. Na coleta de sangue materno pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Pode ocorrer um pequeno desconforto na troca dos tubos. Para minimizar esse desconforto e a formação de hematomas, a coleta será realizada por um profissional experiente. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis, de forma que não há risco de contaminação. Após a coleta, será feita a compressão local para garantir o estancamento do sangramento. Caso você esteja usando anticoagulante, essa compressão será feita pelo tempo que for necessário e não será realizada nova coleta de sangue. A coleta do sangue de cordão umbilical e dos fragmentos de placenta não oferece nenhum risco a você e ao seu bebê, pois são estruturas que normalmente são descartadas após o parto.

Os resultados dessa pesquisa poderão contribuir para o melhor entendimento da pré-eclâmpsia e para que as gestantes que apresentam risco de desenvolver a doença sejam identificadas precocemente.

Para participar deste estudo, você não terá nenhum custo, uma vez que as coletas serão feitas quando você vier fazer a consulta do seu acompanhamento pré-natal, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização. Você terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para recusar-se a participar a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, podendo retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que você é atendida pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificada em nenhuma publicação resultante dessa pesquisa. Os resultados obtidos, quando essa pesquisa for finalizada, serão entregues ao seu obstetra e estarão à sua disposição.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica da participante: _____

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, na Faculdade de Farmácia/UFMG e a outra será fornecida a você. Os documentos e os materiais biológicos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável até a finalização do projeto na sala 4104, Bloco 3, 3º andar, da Faculdade de Farmácia da UFMG e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos. Os pesquisadores responsáveis se comprometem a cumprir integralmente o que está descrito neste termo e a esclarecer qualquer dúvida que possa surgir. Se você estiver de acordo, por favor, assine este termo.

Eu, _____, portadora do documento de Identidade _____ fui informada dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa "Caracterização genética, imunológica, hemostática, bioquímica e angiogênica das gestantes com fatores de risco e/ou com pré-eclâmpsia atendidas nos Centros de Saúde do Distrito Oeste e na Maternidade Odete Valadares em Belo Horizonte/MG", de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

() Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

() Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisas, mas serei comunicada pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de assentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome completo da participante

Data

Assinatura da participante

Nome completo do Pesquisador Responsável: Dra. Patrícia Nessralla Alpoim
Endereço: Faculdade de Farmácia-UFMG, Bloco 3, Sala 4108. Av. Antônio Carlos,
6627. CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG
Telefone: (31) 3409-7492
E-mail: patnessralla@yahoo.com.br

Assinatura do pesquisador responsável

Alpoim:0711482

Assinado de forma digital por Patrícia Nessralla

Nessralla Alpoim:07114D8a2t0a631

Dados: 2021.11.18

13:49:49 -03'00'

0631

Nome completo do

Pesquisador: Endereço:

CEP: / Belo Horizonte – MG

Telefones: (31)

E-mail:

Assinatura do pesquisador (Membro da equipe de pesquisa)

Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá

consultar: COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II. 2º andar - Sala 2005.

Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG - Brasil. CEP: 31270-901.

E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

Comissão de Ética da FHEMIG

Cidade Administrativa de Minas Gerais

Rodovia Papa João Paulo II, 3777. Edifício Gerais - 13º andar.

Bairro Serra Verde. Belo Horizonte, MG - Brasil. CEP: 31630-901

E-mail: adc.etica@fhemig.mg.gov.br. Tel: 3915-9500.

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP-SMSA/BH)

Rua Frederico Bracher Junior, 103. 3º andar/sala 2.

Bairro Padre Eustáquio. Belo Horizonte, MG - Brasil. CEP: 30720-000

E-mail: coep@pbh.gov.br. Tel: 3277-5309.

APÊNDICE C

FICHA CLÍNICA
Projeto PE Longitudinal

Paciente nº:	Prontuário:	Grupo: ☐ N ☐ PE (IG: _____)
1. Identificação		
Nome:		
Data de nascimento:		
Idade:		
Etnia:		
Estado civil:		
Nacionalidade/Naturalidade:		
Escolaridade:		
Endereço:		
Cel/Wapp:		
2. Comorbidades/Observações importantes:		
(Doenças autoimunes, doenças hepáticas, doenças renais, doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, complicações em gestação anterior, etc)		
Já teve COVID? Quando? Já se vacinou? Quantas doses?		
3. Informações sobre a(s) gestação(ões)		
Gravidez gemelar? ☐ Sim ☐ Não		Sexo: ☐ Menino ☐ Menina ☐ Ambos
GPA, (Gravidez Parto Aborto): / /		
Primeira gestação? ☐ Sim ☐ Não		
Quantos filhos vivos:		
Mesmo pai? ☐ Sim ☐ Não		
Quantos partos anteriores: Normal -		Cesárea -
Intervalo interpartal:		
Teve algum parto prematuro? ☐ Sim ☐ Não		
Principais queixas:		
☐ Cefaleia ☐ Epigastralgia ☐ Escotoma ☐ Outros:		
Fatores de risco: ☐ PE prévia ☐ Histórico de PE familiar ☐ Histórico de PE na família do pai do bebê ☐ Primigesta ☐ Primipaternidade ☐ Doença renal crônica (DRC) ☐ Hipertensão arterial crônica (HAC)		☐ Limite extremo de idade (≤ 18 e ≥ 35 anos) ☐ Intervalo longo entre gestações (> 10 anos) ☐ Gestação múltipla ☐ Grupo sanguíneo AB ☐ Etnia não branca ☐ Diabetes mellitus ☐ IMC ≥ 35 kg/m ²

4. Informações clínicas

Altura:

Grupo sanguíneo:

Período da coleta	12-19 semanas	20-29 semanas	30-34 semanas	> 34 semanas
Data				
Idade gestacional				
Pressão arterial				
Peso				
IMC				
Sintomas				
Edema	☐ Sim ☐ Não	☐ Sim ☐ Não	☐ Sim ☐ Não	☐ Sim ☐ Não
Proteinúria	☐ Sim ☐ Não	☐ Sim ☐ Não	☐ Sim ☐ Não	☐ Sim ☐ Não
Medicamentos	☐ Nifedipina ☐ Metildopa ☐ Carbonato de cálcio ☐ Sulfato ferroso ☐ AAS ☐ Outros:	☐ Nifedipina ☐ Metildopa ☐ Carbonato de cálcio ☐ Sulfato ferroso ☐ AAS ☐ Outros:	☐ Nifedipina ☐ Metildopa ☐ Carbonato de cálcio ☐ Sulfato ferroso ☐ AAS ☐ Outros:	☐ Nifedipina ☐ Metildopa ☐ Carbonato de cálcio ☐ Sulfato ferroso ☐ AAS ☐ Outros:

5. Coleta de urina

	12-19s	20-29s	30-34s	>34s	Pós-parto
	H:	H:	H:	H:	H:
Glicose					
Bilirrubina					
Cetona					
Densidade					
Sangue					
pH					
Proteína					
Urobilinogênio					
Nitrito					
Leucócitos					

6. Acolhimento
Gravidez planejada? ☐ Sim ☐ Não
Rede de apoio? ☐ Sim ☐ Não
Trabalha fora? ☐ Sim ☐ Não Carga horária: Qual atividade exerce?
Caso tenha outros filhos, onde/com quem eles ficam para trabalhar? ☐ Creche ☐ Escola ☐ Avós ☐ Pai do bebê Outro:
Está em um relacionamento sério com o pai do bebê? ☐ Sim ☐ Não
Como está o relacionamento afetivo/convivência com o pai? ☐ Ruim ☐ Normal ☐ Bom
Sente apoio do seu parceiro/pai do bebê? ☐ Nenhum ☐ Pouco ☐ Muito
Se pudesse se descrever em relação a gravidez com uma palavra, qual seria? ☐ Triste ☐ Feliz ☐ Normal Outro:
Observações:
7. Alimentação
Toma refrigerante? ☐ Não ☐ Sim
Consumia/Consome álcool? ☐ Não ☐ Sim Quantidade:
Consome peixes e frutos do mar? ☐ Não ☐ Sim Quantidade/dia: Qual(is):
Leites e derivados? ☐ Não ☐ Sim Quantidade/dia:
Castanhas, nozes, avelã, amendoim? ☐ Não ☐ Sim
Ingestão de água/dia: ☐ Até 1L ☐ 1L-2L ☐ >2L
Funcionamento do intestino: ☐ Todo dia ☐ Dia sim, dia não ☐ 2 ou mais dias sem evacuar
Consome alimentos integrais? ☐ Não ☐ Sim Qual(is):
Toma algum chá? ☐ Não ☐ Sim Quais:
Alguma alergia alimentar? ☐ Não ☐ Sim Qual(is):
Observações:
8. Anotações importantes

APÊNDICE D



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**

Procedimento Operacional Padrão

Título: Processamento das amostras Código: POP Versão: 02		
Elaborado por: Fernanda Santos Mendes	Revisado por: Mara Quintela Maia	Aprovado por: Patrícia Nessralla Alpoim
Cargo: Aluna	Cargo: Aluna	Cargo: Professora
Data: 04/12/2017	Data: 29/11/2021	Páginas: 2

**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO
PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE SANGUE**

- Para a coleta de sangue, serão utilizados 5 tubos respeitando-se a seguinte ordem: **2 CITRATO**, **1 SORO**, **1 HEPARINA**, **1 EDTA** (eles podem ficar no máximo 1h em temperatura ambiente após a coleta). O segundo tubo de CITRATO coletado deve ser marcado com um asterisco.
- Após a coleta, em primeiro lugar, realizar o teste de Hemograma com o tubo de EDTA. O resultado deve ser arquivado junto com a ficha clínica da paciente.
- Em seguida, centrifugar os tubos de sangue na centrífuga do Banco de Sangue da Maternidade, seguindo-se as etapas abaixo:
 1. distribuir os tubos de sangue na centrífuga aos pares, de forma que fiquem equilibrados. Os pares devem estar igualmente cheios e serem colocados em posições opostas;
 2. fechar a tampa da centrífuga empurrando-a levemente para baixo. O travamento é automático;
 3. escolher a velocidade e o tempo de corrida a serem utilizados, sendo que serão realizadas 2 centrifugações diferentes, a saber:
 - Citratos e Eppendorf: 3000g a 15min (tecla 6)
 - Soro, Heparina e EDTA: 4000rpm a 10min (tecla 5)
 4. pressionar a tecla START para iniciar a centrifugação;
Obs.: se a centrífuga estiver desequilibrada, aparecerá a mensagem IMBALANCED LOAD e o funcionamento será interrompido.
 5. Esperar o término da centrifugação (aparecerá a mensagem END OF RUN), apertar a tecla OPEN e retirar os tubos com cuidado.

• Após a centrifugação dos Citratos, selecionar o que estiver marcado com um asterisco para aliquotar a amostra do teste de geração de trombina (obtenção do plasma pobre em plaquetas - PPP), da seguinte forma:

- coletar 1500µL do plasma, com cuidado para não ressuspender as plaquetas, e transferir para um eppendorf (os eppendorfs estão separados num plástico com a identificação: TUBOS PARA A 1ª CENTRIFUGAÇÃO - PPP);

- realizar uma segunda centrifugação (3000g a 15min) com o eppendorf, coletar 1200µL do plasma obtido, com cuidado para não ressuspender as plaquetas, e transferir para um criotubo.

• Após a centrifugação dos outros tubos de sangue, aliquotar 4 amostras de 500uL do plasma de cada um, conforme descrito abaixo:

- **CITRATO**: 4 criotubos com 500uL cada;

- **SORO**: 4 criotubos com 500uL cada;

- **HEPARINA**: 4 criotubos com 500uL cada;

- **EDTA**: 4 criotubos com 500uL cada. Em seguida, verter o sedimento para outro criotubo, o qual será utilizado para extração de DNA.

Obs.: caso não seja possível aliquotar 500uL exatos, dividir o plasma obtido em 4 volumes iguais em cada um dos criotubos.

OBSERVAÇÕES:

1) Os criotubos serão previamente identificados com durex colorido de acordo com o período da coleta conforme descrito abaixo, portanto, atentar-se às cores no momento da pipetagem.

12-19 semanas: Vermelho
20-29 semanas: Azul
30-34 semanas: Verde
>34 semanas: Amarelo

2) A identificação das pacientes em estudo seguirá o código sequencial GE01 a GE100. Na etiqueta adesiva dos criotubos, escrever com a caneta permanente presente na maleta: código correspondente, primeiro nome da paciente e tubo de sangue referente àquele criotubo (lembrar de identificar o criotubo do teste de geração de trombina como 'PPP' e o criotubo da extração de DNA como 'Sedimento'). Exemplos:

GE05 – Heparina Luciana	GE23 – Sedimento Naiara	GE68 – PPP Maria
----------------------------	----------------------------	---------------------

3) As etiquetas adesivas deverão ser coladas de forma que contornem o criotubo, colando-se uma extremidade na outra por fora do tubo.

4) A coleta de sangue de cada paciente irá gerar 18 criotubos: 1 de PPP oriundo de um CITRATO, 4 do outro CITRATO, 4 de SORO, 4 de HEPARINA e 5 de EDTA, sendo 1 destes referente ao sedimento para extração de DNA. Estes tubos devem ser acondicionados nos saquinhos apropriados fechados com um nó e armazenados no botijão de Nitrogênio.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**

Procedimento Operacional Padrão

Título: Processamento das amostras de urina Código: POP Versão: 01	
Elaborado por: Mara Quintela Maia	Aprovado por: Patrícia Nessralla Alpoim
Cargo: Aluna	Cargo: Professora
Data: 29/11/2021	Páginas: 1

**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO
PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE URINA**

- 1) Conduzir a gestante para a coleta de urina orientando que o primeiro jato deve ser desprezado. Após a coleta, a amostra poderá ficar no máximo 1h em temperatura ambiente.
- 2) Transferir a amostra para tubo falcon apropriado.
- 3) Passar a fita reagente na amostra.
- 4) Anotar o horário em que a coleta foi realizada e os resultados da fita na ficha clínica da paciente.
- 5) Centrifugar o tubo em 1500g a 10min na centrífuga do Laboratório (tecla 6). Para esta centrifugação, utilizar os suportes vermelhos apropriados para tubo falcon guardados no armário abaixo da centrífuga.
- 6) Aliquotar 2000uL em 2 criotubos.
- 7) Identificar os criotubos conforme descrito no POP de coleta de sangue.
Exemplo: GE34 - Urina
Luana

8) Juntar os 2 criotubos obtidos com os 18 da coleta de sangue e armazenar no botijão de Nitrogênio.

APÊNDICE E

Solução 1 – pH 7,2 a 7,4 a 25°C

- Fosfato de sódio dibásico anidro PA - 8,1mM (Sigma-Aldrich)
- Fosfato de potássio monobásico anidro - 1,5mM (Sigma-Aldrich)
- Cloreto de sódio - 137mM (Sigma-Aldrich)
- Cloreto de potássio PA - 2,7mM (Sigma-Aldrich)

Solução 2 – pH 7,4±0,03 a 25°C

- Fosfato de sódio dibásico anidro PA - 10mM (Sigma-Aldrich)
- Fosfato de potássio monobásico anidro - 1,8mM (Sigma-Aldrich)
- Cloreto de sódio - 150mM (Sigma-Aldrich)
- Cloreto de potássio PA - 2,8mM (Sigma-Aldrich)
- Tween 20 - 0,1%v/v (Sigma-Aldrich)
- Proclin 300 - 0,1%v/v (Sigma-Aldrich)

Solução 3 – pH 7,2 a 7,4 a 25°C

- Fosfato de sódio dibásico anidro PA - 8,1mM (Sigma-Aldrich)
- Fosfato de potássio monobásico anidro - 1,5mM (Sigma-Aldrich)
- Cloreto de sódio - 137mM (Sigma-Aldrich)
- Cloreto de potássio PA - 2,7mM (Sigma-Aldrich)
- Albumina bovina - 1%p/v (Sigma-Aldrich)

Solução 4

- Ácido sulfúrico - 0,5M (Synth)

Solução 5 – pH 9,5±0,03 a 25°C

- Carbonato de sódio - 15mM (Sciavicco)
- Bicarbonato de sódio - 85mM (Sigma-Aldrich)

Solução 6 – pH 7,4±0,03 a 25°C

- Sacarose - 10%p/v (Sigma-Aldrich)
- Cloreto de sódio - 150mM (Sigma-Aldrich)
- Albumina bovina - 1%p/v (Sigma-Aldrich)

Solução 7 – pH 7,4±0,03 a 25°C

- Fosfato de sódio dibásico anidro PA - 100mM (Sigma-Aldrich)
- Fosfato de potássio monobásico anidro - 17mM (Sigma-Aldrich)
- Cloreto de sódio - 150mM (Sigma-Aldrich)
- Cloreto de potássio PA - 28mM (Sigma-Aldrich)
- Albumina bovina - 1%p/v (Sigma-Aldrich)
- Sacarose - 15%p/v (Sigma-Aldrich)
- D-manitol - 1%p/v (Synth)
- Proclin 300 - 0,1%v/v (Sigma-Aldrich)