

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS

FERNANDA SANTOS MENDES

**AVALIAÇÃO DOS FATORES ANGIOGÊNICOS, PIGF E sFLT-1, NA
PRÉ-ECLÂMPsia**

Belo Horizonte
2019

FERNANDA SANTOS MENDES

**AVALIAÇÃO DOS FATORES ANGIOGÊNICOS, PIGF E sFLT-1, NA
PRÉ-ECLÂMPZIA**

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 grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Prof^a Dra. Patrícia Nessler Alpoim
Coorientadora: Prof^a Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse

Belo Horizonte
2019

M538a Mendes, Fernanda Santos.
Avaliação dos fatores angiogênicos, PIGF e sFLT-1, na pré-eclâmpsia / Fernanda Santos Mendes. – 2019.
83 f. : il.

Orientadora: Patrícia Nessralla Alpoim.
Coorientadora: Luci Maria Sant'Ana Dusse.

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

1. Pré-eclâmpsia – Teses. 2. Angiogênese – Teses. 3. Biomarcadores – Teses. 4. Estudos transversais – Teses. 5. Estudos longitudinais – Teses. I. Alpoim, Patrícia Nessralla. II. Dusse, Luci Maria Sant'Ana. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:618.3



FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DOS FATORES ANGIOGÊNICOS, PIGF E sFLT-1, NA PRÉ-ECLÂMPsia

FERNANDA SANTOS MENDES

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 25 de fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Patrícia Nessler Alpoim
Profa. Patrícia Nessler Alpoim - Orientadora
UFMG

Luci Dusse
Profa. Luci Maria Sant Ana Dusse
UFMG

Luiza Oliveira Perucci
Profa. Luiza Oliveira Perucci
UFOP

Jacqueline Braga Pereira
Profa. Jacqueline Braga Pereira
UFMG

Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho

*À Deus, que me guia e está presente em meu caminho e na minha vida
À minha querida mãe, pelo apoio, amor incondicional e incentivo sempre
Às minhas irmãs, cunhados e sobrinhos que são meu porto seguro
Ao meu namorado, Bruno, pelo companheirismo, amor, paciência e apoio sempre
Aos familiares e amigos por estarem sempre presentes.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me guiar por todo este caminho, por tornar possível a trajetória e por me abençoar sempre.

À professora Patrícia Nessralla Alpoim por toda orientação, carinho, dedicação, amizade, paciência e principalmente pelos conselhos que me permitiram concluir esta etapa e me incentivaram a dar continuidade aos meus estudos.

À professora Luci Maria Sant'Ana Dusse por todo carinho, orientação, dedicação, paciência e por ter depositado em mim confiança do meu trabalho. E principalmente por me ajudar a não desistir da área acadêmica, me despertando para aquilo que faço com muito amor e que gosto de fazer.

À Rejane Diniz, pela grande orientação nas análises estatísticas.

À professora Karina Braga Gomes Borges pela disponibilidade nos momentos de dúvidas.

À FAPEMIG, CNPQ e CAPES por tornarem possível este trabalho por meio dos recursos disponibilizados.

Aos pesquisadores do Centro de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas da UFMG que tiveram a idealização da parte do estudo longitudinal envolvendo gestantes com pré-eclâmpsia e que cederam alíquotas para a realização do presente estudo.

Aos funcionários, professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas que tornaram esta trajetória mais doce e harmoniosa.

À Letícia Lopes que foi um presentinho que ganhei, que me ajudou e incentivou muito e principalmente pela linda amizade que construímos. Pessoa repleta de luz!

À Lídia Lana pelos momentos de trabalho, de papos, de distração, e por todo auxílio nos experimentos e nos dilemas da vida hehehe. Outro presentinho que ganhei por causa do mestrado.

À Andreia da secretaria do Programa de Pós-graduação que esteve sempre disposta a ajudar e que me auxiliou muito.

À minha mãe, Márcia, por ser minha melhor amiga, por me apoiar, amar, encorajar, por sempre acreditar em meu potencial e com isso fazer com que eu mesma acredite também. Por ser minha fã número 1, por sempre me prestigiar e por falar de mim às pessoas com todo o orgulho do mundo!

Ao meu namorado, Bruno, por me amar, incentivar, encorajar, apoiar, cuidar de mim. Enfim por ser um companheiro maravilhoso. Por me ajudar a ser uma pessoa melhor e a cuidar do meu lado emocional me fazendo feliz.

Às minhas irmãs, Karina e Kamila, por serem sempre espelho e exemplos para mim. Além de melhores amigas sempre dispostas a me ouvir, ajudar e incentivar.

Aos meus cunhados, Samir e Fabiano, por todo carinho, cuidado, atenção e amor de pais. E por vibrarem sempre com minhas conquistas.

Aos meus sobrinhos Guh, Sol, Jojo, Laurinha, Ceci e Joá por serem partes do meu coração, serem amores da minha vida, por fazerem meus dias mais alegres, permitindo que essa trajetória fosse mais leve.

Ao meu sogro Alex, sogra Marisa, cunhada Brenda, concunhado Pedro, Vó Zé e toda a família do meu namorado que se faz presente sempre em minha vida, obrigada pelo carinho.

À querida Marli que me auxiliou emocional e espiritualmente durante todo este processo. Ela foi parte essencial para que eu pudesse me conhecer melhor e amadurecer pessoal e profissionalmente. Muito obrigada!

À louca e linda família Santos por estarem sempre presentes! Por ser a melhor família que eu poderia ter e me ensinarem o verdadeiro sentido da palavra "família".

“Um monte de pedras deixa de ser um monte de pedras no momento em que um único homem o contempla, nascendo dentro dele a imagem de uma catedral.”

Antoine de Saint-Exupéry

Resumo

A pré-eclâmpsia (PE) é uma doença exclusivamente gestacional e multissistêmica. Ela é caracterizada pelo aumento da pressão arterial ($\geq 140/90$ mmHg), com ou sem a presença de proteinúria, a partir da 20ª semana de gestação. Sabe-se que a placenta desempenha importante papel na patogênese dessa doença. Durante a gestação, o processo de placentação libera importantes fatores angiogênicos, como o fator de crescimento placentário (PIGF), fator angiogênico, e tirosina quinase fms solúvel tipo 1 (sFlt-1), fator antiangiogênico, que atuam durante este processo e em todo o decorrer da gestação. Estudos demonstraram que durante uma gestação com PE, as concentrações de PIGF diminuem já no início da gestação enquanto as de sFlt-1 aumentam. E a razão entre essas duas concentrações podem estabelecer indícios que auxiliam na predição da PE. A fim de determinar a importância desses níveis e sua eficácia na predição da PE, este estudo objetivou avaliar as concentrações de PIGF e sFlt-1 nas gestantes com PE e nas normotensas realizando um estudo transversal e um estudo longitudinal. No estudo transversal, realizado com gestantes com PE grave e normotensas, os níveis de sFlt-1 foram maiores nas gestantes com PE grave ($p < 0,001$), o PIGF não apresentou diferença, mas a razão de sFlt-1/PIGF foi maior em gestantes com PE ao comparar os dois grupos ($p = 0,009$). Ao se dividir o grupo de PE, em precoce e tardia, os níveis de sFlt-1 foram maiores em ambos ao comparar com as normotensas ($p < 0,001$). Os valores de PIGF não foram diferentes e a razão sFlt-1/PIGF foi maior nas gestantes com PE precoce em relação as normotensas ($p = 0,008$). No estudo longitudinal, foram comparadas gestantes que desenvolveram PE das que não desenvolveram em quatro períodos gestacionais 12-19, 20-29, 30-34 e 35-40 semanas. Nas gestantes que desenvolveram PE as concentrações de PIGF foram menores nos intervalos gestacionais 12-19 e 20-29 semanas ($p = 0,023$ e $p = 0,003$, respectivamente), os níveis de sFlt-1 foram maiores no intervalo de 30 a 34 semanas ($p = 0,025$) e a razão sFlt-1/PIGF foi maior nos períodos gestacionais 12-19 ($p = 0,014$), 20-29 ($p = 0,036$), e 30-34 ($p = 0,025$) em relação as gestantes que não desenvolveram PE. Ao comparar as concentrações de PIGF e sFlt-1, durante os intervalos gestacionais, das gestantes que desenvolveram PE, PIGF foi menor nas primeiras semanas ao comparar 12-19x 20-29 ($p = 0,007$) e 12-19x30-34 ($p = 0,019$). A comparação dos níveis de sFlt-1 e da razão sFlt-1/PIGF não mostrou diferenças significativas neste grupo de gestantes. A mesma comparação no grupo que não desenvolveu PE, mostrou que os níveis de PIGF foram menores entre as semanas: 12-19x20 a 29 ($p < 0,001$), 12-19x30-34 ($p < 0,001$), 12-19x35-40 ($p = 0,01$) e 20-29x30-34 ($p = 0,043$). Os níveis de sFlt-1 foram aumentados na comparação das semanas: 12-19x30-34 ($p = 0,01$), 12-19x35-40 ($p < 0,001$), 20-29x35-40 ($p < 0,001$) e 30-34x35-40 ($p < 0,001$). E a razão sFlt-1/PIGF, foi menor entre as semanas: 12-19x20-29 ($p = 0,001$), 12-19x30-34 ($p < 0,001$), 30-34x35-40 ($p = 0,004$). Diante dessas análises o PIGF se mostrou um bom marcador preditivo, o sFlt-1 um bom marcador diagnóstico e a razão sFlt-1/PIGF pode ser considerada tanto como um bom marcador preditivo quanto como um bom marcador diagnóstico. São necessários estudos prospectivos

longitudinais contendo maior número de amostras, com determinação seriada, para melhor análise.

Palavras chave: Pré-eclâmpsia. PlGF. sFlt-1. Angiogênese. Biomarcadores. Estudo transversal. Estudo longitudinal.

Abstract

Preeclampsia (PE) is an exclusively gestational and multisystemic disease. It is characterized by increased blood pressure ($\geq 140 / 90$ mmHg), with or without the presence of proteinuria, from the 20th week of gestation. The placenta is make an important role in the pathogenesis of this disease. During gestation, the placentation process releases important angiogenic factors, such as placental growth factor (PlGF), angiogenic factor, and soluble tyrosine kinase fms type 1 (sFlt-1), an antiangiogenic factor, that act during this process and throughout the course of gestation. Studies have shown that during a pregnancy with PE, the concentrations of PlGF decrease already in the beginning of gestation while those of sFlt-1 increase. And the ratio between these two concentrations may establish clues that help predict PE. In order to determine the importance of these levels and their efficacy in the prediction of PE, this study aimed to evaluate the concentrations of PlGF and sFlt-1 in pregnant women with PE and in the normotensive women performing a cross-sectional study and a longitudinal study. In the cross-sectional study of pregnant women with severe and normotensive PE, sFlt-1 levels were higher in pregnant women with severe PE ($p < 0.001$), PlGF presented no difference, but the sFlt-1 / PlGF ratio was higher in with PE when comparing the two groups ($p = 0.009$). When dividing the PE group, both early and late, sFlt-1 levels were higher in both compared to normotensive levels ($p < 0.001$). The values of PlGF were not different and the sFlt-1 / PlGF ratio was higher in pregnant women with early PE compared to normotensive women ($p = 0.008$). In the longitudinal study, we compared women who developed PE from those who did not develop in four gestational periods 12-19, 20-29, 30-34 and 35-40 weeks. In the women who developed PE, the concentrations of PlGF were lower in the gestational intervals 12-19 and 20-29 weeks ($p = 0.023$ and $p = 0.003$, respectively), sFlt-1 levels were higher in the range of 30 to 34 weeks ($p = 0.025$), and the sFlt-1 / PlGF ratio was higher in gestational periods 12-19 ($p = 0.014$), 20-29 ($p = 0.036$), and 30-34 ($p = 0.025$) in relation to pregnant women who did not PE. When comparing the concentrations of PlGF and sFlt-1, during gestational intervals, of the women who developed PE, PlGF was lower in the first weeks when comparing 12-19x 20-29 ($p = 0.007$) and 12-19x30-34 ($p = 0.019$). Comparison of sFlt-1 and sFlt-1 / PlGF ratios did not show significant differences in this group of pregnant women. The same comparison in the group that did not develop PE showed that PlGF levels were lower between weeks: 12-19x20 to 29 ($p < 0.001$), 12-19x30-34 ($p < 0.001$), 12-19x35-40 ($p = 0.01$) and 20-29x30-34 ($p = 0.043$). The levels of sFlt-1 were increased in the comparison of the weeks: 12-19x30-34 ($p = 0.01$), 12-19x35-40 ($p < 0.001$), 20-29x35-40 ($p < 0.001$) and 30- 34x35-40 ($p < 0.001$). And the sFlt-1/PlGF ratio was lower between weeks: 12-19x20-29 ($p = 0.001$), 12-19x30-34 ($p < 0.001$), 30-34x35-40 ($p = 0.004$). In view of these analyzes, PlGF proved to be a good predictive marker, sFlt-1 a good diagnostic marker and the sFlt-1/PlGF ratio can be considered both as a good predictive marker and as a good diagnostic marker. Longitudinal prospective studies containing more samples are required, with serial determination, for better analysis.

Keywords: Preeclampsia. PlGF. sFlt-1. Angiogenesis. Biomarkers. Transversal study. Longitudinal study.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

>	MAIOR
≥	MAIOR OU IGUAL
<	MENOR
≤	MENOR OU IGUAL
°C	GRAUS CELSIUS
AT1	RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II DO TIPO-1
AsC	ÁREA SOB A CURVA
CIUR	CRESCIMENTO INTRAUTERINO RESTRITO
CIVD	COAGULAÇÃO INTRAVASCULAR DISSEMINADA
DIST	DIASTÓLICA
EDTA	ÁCIDO ETILENODIAMINO TETRA-ACÉTICO
ELISA	ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA
Eng	ENDOGLINA
EUA	ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA
FIt-1	RECEPTOR DE VEGF 1
g	GRAMAS
GPG	GANHO DE PESO NA GESTAÇÃO
HbF	HEMOGLOBINA FETAL
HC	HOSPITAL DAS CLÍNICAS
hCG	GONADOTROFINA CORIÔNICA HUMANA
HELLP	HEMÓLISE, ENZIMAS HEPÁTICAS ELEVADAS, BAIXA CONTAGEM DE PLAQUETAS
HPRB	HOSPITAL PÚBLICO REGIONAL DE BETIM
HRP	<i>HORSERADISH</i> PEROXIDASE
IG	IDADE GESTACIONAL
IL	INTERLEUCINA
IMC	ÍNDICE DE MASSA CORPORAL
ISSHP	SOCIEDADE INTERNACIONAL PARA O ESTUDO DA HIPERTENSÃO NA GRAVIDEZ
KDR	RECEPTOR DE DOMÍNIO DE INSERÇÃO DE QUINASE
L	LITRO
mg	MILIGRAMAS

mg/dL	MILIGRAMAS POR DECILITRO
mmHg	MILÍMETROS DE MERCÚRIO
MOV	MATERNIDADE ODETE VALADARES
NK	<i>NATURAL KILLER</i>
NM	NANÔMETROS
NO	ÓXIDO NÍTRICO
PA	PRESSÃO ARTERIAL
PE	PRÉ-ECLÂMPsia
PGI2	PROSTACICLINA ENDOTELIAL
pg/mL	PICOGRAMA POR MILILITRO
PIGF	FATOR DE CRESCIMENTO PLACENTÁRIO
pg	PICOGRAMA
ROC	CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DO RECEPTOR
ROS	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO
RPM	ROTAÇÕES POR MINUTO
SIST	SISTÓLICA
sFlt-1	TIROSINA QUINASE FMS SOLÚVEL TIPO 1
sEng	ENDOGLINA SOLÚVEL
sVEGFR-1	RECEPTOR DE VEGF SOLÚVEL DO TIPO 1
TGF-β	FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMANTE BETA
TMB	TETRAMENTILBENCIDINA
TNF	FATOR DE NECROSE TUMORAL
TNF α	FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA
UBSF	UNIDADE BÁSICA DE SAÚDE DA FAMÍLIA
UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
VCAM	MOLÉCULA DE ADESÃO CELULAR VASCULAR
VEGF	FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR
VWF	FATOR DE VON WILLEBRAND

LISTA DE FIGURAS

1 Comparação da anatomia da artéria espiralada em mulheres não grávidas, gestantes com pré-eclâmpsia e gravidez normal. Representação da invasão de trofoblastos na artéria espiralada durante a gestação.....	28
2 Representação esquemática da fisiopatologia da PE	33
3 Representação esquemática do processo de angiogênese	24
4 Representação esquemática da expressão dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos na PE	27
5 Fluxograma de seleção das gestantes para o estudo transversal	42
6 Fluxograma de seleção das gestantes para o estudo longitudinal.....	44
7 Curva ROC da relação de sFlt-1/PIGF com os demais dados dos sub-grupos de gestantes que desenvolveram PE precoce e gestantes que desenvolveram PE tardia	51
8 Log10 dos níveis plasmáticos de PIGF em gestantes que desenvolveram PE e nas que não desenvolveram PE durante os quatro períodos gestacionais avaliados	55
9 Log10 dos níveis plasmáticos de sFlt-1 em gestantes que desenvolveram PE e nas que não desenvolveram PE durante os quatro períodos gestacionais avaliados	56
10 Log10 da razão sFlt-1/PIGF em gestantes que desenvolveram PE e nas que não desenvolveram PE durante os quatro períodos gestacionais avaliados.....	57

LISTA DE TABELAS

1	Características clínicas das gestantes participantes do estudo transversal.....	48
2	Níveis plasmáticos de PIGF e sFlt-1 nas gestantes com PE grave e nas gestantes normotensas do estudo transversal	49
3	Níveis plasmáticos de PIGF e sFlt-1 nas gestantes com PE precoce, com PE tardia e nas gestantes normotensas do estudo transversal	50
4	Características clínicas das gestantes participantes do estudo longitudinal	52
5	Níveis de PIGF, sFlt-1 e razão sFlt-1/PIGF em gestantes que desenvolveram e não desenvolveram PE em cada período gestacional.....	54
6	Níveis de PIGF, sFlt-1 e razão sFlt-1/PIGF em gestantes que desenvolveram e não desenvolveram PE comparando-se os períodos gestacionais dois a dois	58

Sumário

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Pré-eclâmpsia	19
2.2 Angiogênese.....	22
2.2.1 <i>Fatores angiogênicos</i>	24
2.2.2 <i>Fator de crescimento placentário (PIGF)</i>	25
2.2.3 <i>Tirosina quinase Fms solúvel do tipo 1 (sFlt-1)</i>	26
2.3 <i>Fisiopatologia da pré-eclâmpsia</i>	27
2.4 <i>Fatores angiogênicos relacionados à PE</i>	35
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos.....	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Casuística	41
4.1.1 <i>Aspectos éticos</i>	41
4.1.2 <i>Seleção das integrantes do estudo</i>	41
4.2 Métodos.....	46
4.2.1 <i>Determinação de PIGF</i>	46
4.2.2 <i>Determinação de sFlt-1</i>	46
4.3 Análise estatística	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Estudo transversal	48
5.1.1 <i>Características clínicas</i>	48
5.1.2 <i>Avaliação dos níveis plasmáticos de PIGF e sFlt-1 nas gestantes com PE grave e nas gestantes normotensas</i>	49
5.2 Estudo longitudinal.....	52
5.2.1 <i>Características clínicas</i>	52
5.2.2 <i>Avaliação dos níveis plasmáticos de PIGF e sFlt-1 nas gestantes com PE grave e nas gestantes normotensas</i>	53
6 DISCUSSÃO	60
6.1 Estudo transversal	60

6.2 Estudo longitudinal	67
7 CONCLUSÃO	71
8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	72
9 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

O corpo feminino passa por diversas mudanças fisiológicas, durante a gestação, com a finalidade de transformar o ambiente para receber, nutrir e gerar um feto. Porém, podem ocorrer intercorrências durante o estabelecimento da gestação que acarretam problemas para a mãe e para o feto.

A pré-eclâmpsia (PE) consiste em uma doença gestacional, multissistêmica e de caráter mundial. Seu mecanismo de ocorrência ainda não é totalmente elucidado. O aumento da pressão arterial sistólica e diastólica consiste no principal sintoma clínico dessa doença. Associado ao aumento da pressão arterial estão alguns achados laboratoriais indicativos de dados renais e sistêmicos como por exemplo as concentrações séricas aumentadas de creatinina. A proteinúria, que há anos era incluída no diagnóstico, pode não estar presente e por isso não é mais usada como critério diagnóstico.

Durante uma gestação considerada normal, as concentrações séricas de PIGF, um fator angiogênico, são estáveis durante as semanas iniciais, tendo sua diminuição ao final da gestação, quando os níveis de sFlt-1, fator antiangiogênico, sofrem seu aumento. O equilíbrio desses fatores é necessário para uma adequada placentação e boa evolução da gestação. Porém, durante a PE, esses níveis sofrem alterações desenvolvendo um desequilíbrio no processo de angiogênese, que é importante para o encadeamento da gestação. Devido a sua importância para a clínica, os fatores, PIGF e sFlt-1, estão sendo estudados no plasma materno com a finalidade de avaliar a sua acuidade como biomarcadores para a predição do aparecimento da PE.

Por se tratar de uma doença multissistêmica, os danos que ocorrem, devido as alterações sistêmicas, podem ser graves e muitas vezes até irreversíveis, ainda considerando que a morte da mãe e/ou feto consiste em parte dos desfechos dessa doença. Até o momento, não existem biomarcadores precoces e que sejam específicos para a predição da PE. O diagnóstico é, portanto, realizado após 20 semanas de gestação quando diversos danos e alterações já ocorreram. Por esse motivo, visando uma melhor condição de vida, para a mãe e o feto, o diagnóstico precoce tem-se tornando cada vez mais necessário. Desta maneira, a intervenção clínica em tempo hábil possibilita que os casos não se tornem tão graves e até mesmo mortais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pré-eclâmpsia

A PE é uma síndrome exclusivamente gestacional sendo a segunda principal causa de morbidade, mortalidade e complicações maternas e/ou perinatais (MOL *et al.*, 2015; ZHONG; ZHU; DING, 2015). A PE pode ser definida pelo desenvolvimento de hipertensão, acompanhada ou não de proteinúria, em grávidas normotensas, após 20 semanas de gestação (NERLYNE; LYNDE, 2016; ZHONG; ZHU; DING, 2015).

A apresentação clínica da PE é variada, incluindo desde hipertensão grave, de início precoce, acompanhada de crescimento intrauterino restrito (CIUR), à hipertensão leve, de início tardio, sem CIUR e poucas complicações a longo prazo. Isso deve-se à resposta materna à anormalidade placentária ou à sua função (WU *et al.*, 2015).

Em 2014, a Sociedade Internacional para o Estudo da Hipertensão na Gravidez (ISSHP) alterou os critérios de diagnóstico da PE em relação à presença de proteinúria. Segundo essa definição, a proteinúria não é mais obrigatória na confirmação da PE. Na sua ausência, para diagnosticar a doença, a hipertensão deverá ser associada a evidências de comprometimento sistêmico como trombocitopenia, cefaleia, níveis elevados de transaminases hepáticas, dor epigástrica, insuficiência renal, edema pulmonar, distúrbios visuais e/ou cerebrais, e CIUR (CHAIWORAPONGSA; CHAEMSAITHONG; YEO; *et al.*, 2014; MARTINEZ-FIERRO *et al.*, 2018; MOL *et al.*, 2015; TRANQUILLI *et al.*, 2014).

Na ausência da evidência de proteinúria, pode optar por avaliar as concentrações de creatinina sérica. Segundo Chaiworapongsa *et al.* a proporção da concentração urinária de creatinina varia ao longo do dia, mas não há alteração na sensibilidade e especificidade para prever a proteinúria. Sendo assim, considera-se os níveis de creatinina $\geq 30\text{mg/mmol}$ ou $>97\text{mmol/L}$, associada à hipertensão, para o diagnóstico de PE (CHAIWORAPONGSA; CHAEMSAITHONG; YEO; *et al.*, 2014).

A hipertensão arterial caracteriza-se por pressão arterial sistólica maior que 140mmHg e/ou diastólica maior que 90mmHg. A proteinúria caracteriza-se pela concentração de proteínas totais com valores iguais ou maiores que 300mg, em amostras de urina 24 horas, ou maior que 30mg/dL em amostra única de urina (CHAIWORAPONGSA; CHAEMSAITHONG; KORZENIEWSKI; *et al.*, 2014; ZHONG; ZHU; DING, 2015).

Atualmente a PE é classificada, em PE precoce e PE tardia, de acordo com a idade gestacional em que os sintomas aparecem. A PE é denominada de início precoce quando o surgimento dos sintomas ocorre antes da 34ª semana de gestação e a de início tardio quando eles surgem durante ou após a 34ª semana. O aparecimento das duas formas está associado à alteração sistêmica de diferentes marcadores bioquímicos, fatores de risco genéticos e ambientais, prognóstico e características clínicas (LASKOWSKA *et al.*, 2013; NERLYNE; LYNDE, 2016; RAYMOND; PETERSON, 2011). A PE também é classificada de acordo com os níveis pressóricos em leve e grave. A PE leve cursa com pressão arterial maior ou igual a 140/90mmHg medidas duas vezes no intervalo de 4 horas, e a forma grave, maior ou igual a 160/110mmHg um intervalo de medição mais curto. A forma grave também está associada à proteinúria intensa ($\geq 2g/24$ horas) e/ou disfunção orgânica substancial materna e pode evoluir para o óbito. Em alguns casos, a progressão dos sintomas de leve para grave pode ser de forma rápida, inesperada e até mesmo fulminante (NERLYNE; LYNDE, 2016; OMS, 2011).

A gestante com PE pode manter a hipertensão, sem maiores complicações até o término da gestação ou evoluir para quadros mais graves como a eclâmpsia, síndrome HELLP (hemólise, enzimas hepáticas elevadas e baixa de plaquetas) e coagulopatia grave. A eclâmpsia é definida por alteração do sistema nervoso central e surgimento de convulsões que não podem ser explicados por outras causas. Normalmente se manifesta de forma tardia, após o surgimento dos sintomas e sinais sistêmicos da doença, porém pode se apresentar sem outros sinais de alerta. Não há informações precisas da incidência de PE a nível mundial, mas estima-se que ocorra em 3-5% das gestações. No Brasil, a incidência é de 1,5 casos a cada 100 gestações (RAMOS; SASS; COSTA, 2017). A eclâmpsia acomete, mundialmente, de 2,7 a 8,2 mulheres a cada 10.000 (CHAIWORAPONGSA; CHAEMSAITHONG; YEO; *et al.*, 2014; NERLYNE; LYNDE, 2016), enquanto que no Brasil, sua incidência é de 0,6% (RAMOS; SASS; COSTA, 2017). A síndrome HELLP caracteriza-se pelo surgimento de hemólise, elevação dos níveis de enzimas hepáticas elevadas e baixa contagem de plaquetas (LEAÑOS-MIRANDA *et al.*, 2017). A coagulopatia decorre da trombocitopenia e pode evoluir para coagulação intravascular disseminada (CIVD) (NERLYNE; LYNDE, 2016).

Tais complicações da PE podem desencadear acidentes cerebrovasculares, ruptura hepática, edema pulmonar e insuficiência renal aguda, que podem levar à

morte materna e/ou perinatal (CHAIWORAPONGSA; CHAEMSAITHONG; KORZENIEWSKI; *et al.*, 2014). As complicações fetais, como o CIUR e até a morte estão atribuídas, principalmente, ao parto prematuro devido à interrupção gestacional com a remoção total da placenta. Autores descrevem que esta remoção consiste na única forma de cura da doença, porém a remoção não freia a liberação e/ou ação dos fatores inflamatórios, sendo portanto, o tratamento inicial (CHAIWORAPONGSA; CHAEMSAITHONG; KORZENIEWSKI; *et al.*, 2014).

Não há como prever o aparecimento da PE, somente é possível avaliar se a gestação é de risco mediante a história obstétrica da gestante e pelos fatores de riscos avaliados, isoladamente. Dentre os fatores de risco estão mulheres jovens, em sua primeira gestação; mulheres que se submeteram à fertilização *in vitro*; mulheres múltiplas em gestação com pais em primipaternidade. Uma explicação plausível, para o aumento do risco de PE nessas mulheres, é o curto intervalo entre o primeiro coito e a concepção (CHAIWORAPONGSA; CHAEMSAITHONG; YEO; *et al.*, 2014; NADERI; TSAI; KHANDELWAL, 2017). Alguns estudos atribuem essa condição ao sistema imunológico materno que, por meio da exposição ao fluido seminal e/ou ao esperma, desenvolve tolerância à aloantígenos paternos (REDMAN; SARGENT, 2010). Desta maneira, acredita-se que a exposição prolongada ao sêmen está relacionada à diminuição do risco de desenvolvimento da PE. (CHAIWORAPONGSA; CHAEMSAITHONG; KORZENIEWSKI; *et al.*, 2014; NADERI; TSAI; KHANDELWAL, 2017). Mulheres em gestações gemelares apresentam cerca de duas a três vezes mais chances de risco de desenvolvimento da doença do que gestações com apenas um feto. Acredita-se que isso ocorra devido ao aumento da massa placentária, nas gestações múltiplas, o que pode predispor a hipóxia relativa e ao aumento dos fatores antiangiogênicos (NADERI; TSAI; KHANDELWAL, 2017).

Ademais destes critérios de risco, apontados para o desenvolvimento da PE, pode-se citar: histórico de PE em gestações anteriores; idade materna extrema (menor que 15 anos ou maior que 35); histórico familiar de PE; condições médicas pré-existentes como obesidade, hipertensão crônica, diabetes mellitus, síndrome antifosfolípide, trombofilia, doença auto-imune, doença renal, infertilidade e infecção do trato urinário (CHAIWORAPONGSA; CHAEMSAITHONG; KORZENIEWSKI; *et al.*, 2014; NADERI; TSAI; KHANDELWAL, 2017). Além disso, o termo “pai perigoso” é utilizado para identificar homens em que as mães tiveram PE durante a sua gestação,

pois acredita-se que isso possa influenciar no aumento do risco em suas parceiras (DEKKER; ROBILLARD; ROBERTS, 2011).

Muitas pesquisas se concentram na identificação de mulheres com alto risco de desenvolvimento da PE. Sendo assim, esta avaliação permite um monitoramento mais intenso desse grupo que possui alto risco, bem como uma ação profilática mais direcionada, diagnóstico e tratamentos oportunos. Portanto, a identificação de biomarcadores de PE, presentes no início da gravidez, permitiria a segmentação adequada do risco associado àquela gestação de modo a tornar possível realizar as intervenções terapêuticas específicas e necessárias. Desta maneira, as mortes maternas e/ou perinatais poderiam ser evitadas com mais facilidade (WU *et al.*, 2015).

2.2 Angiogênese

A angiogênese consiste, por definição, no crescimento de novos vasos, de células endoteliais, a partir de vasos já pré-existentes (BOELDT; BIRD, 2017). É um processo morfogenético, multicelular, altamente dinâmico, complexo e fundamental para o desenvolvimento de tecidos e órgãos, embora cada um deles tenha suas estruturas vasculares diferentes. Os vasos individuais são formados pela diferenciação de células precursoras endoteliais em células endoteliais. Em uma situação onde há hipóxia tecidual, os sinais enviados desencadeiam a angiogênese (BENTLEY; CHAKRAVARTULA, 2017). Nos tecidos de adultos saudáveis, a manutenção da vasculatura é mais comum do que a criação de novos vasos. Mas ao longo do ciclo menstrual e durante a gestação, o crescimento de vasos uterinos é mais comum (BENTLEY; CHAKRAVARTULA, 2017).

Muitos estudos sugerem que a angiogênese ocorre pela abundância de fatores pró-angiogênicos em relação aos fatores antiangiogênicos. Acredita-se que o aumento de hormônios, como gonadotrofina coriônica humana, estradiol e progesterona pode desviar o equilíbrio a favor da angiogênese. Além disso, a presença de fatores de crescimento elevados e citocinas, devido ao processo de implantação e placentação, contribuem para desviar o equilíbrio a favor da formação de novos vasos (BOELDT; BIRD, 2017; MOFFETT-KING, 2002). Doenças como câncer e retinopatia diabética podem apresentar uma angiogênese patológica, em que os vasos podem assumir morfologias anormais, podendo ser tortuosas, bulbosas e/ou mal ramificadas (BENTLEY; CHAKRAVARTULA, 2017).

Os vasos sanguíneos são muito importantes para o desenvolvimento da placenta durante a gravidez. Os três mecanismos envolvidos no desenvolvimento vascular são: angiogênese, vasculogênese e circulação colateral (MUNDIM *et al.*, 2016). A angiogênese, como anteriormente citada, consiste no desenvolvimento de novos vasos a partir de vasos pré-existentes. A vasculogênese compreende no desenvolvimento de vasos a partir de células progenitoras endoteliais em áreas específicas do embrião ou da medula óssea. Já a circulação colateral envolve o remodelamento de vasos pré-existentes e o desenvolvimento de “pontes” nas redes de artérias. Na PE, a angiogênese e a circulação colateral predominam no desenvolvimento da vascularização placentária após a 12^a semana de gestação (MUNDIM *et al.*, 2016).

Para que ocorra a formação de novos vasos, as células endoteliais, do vaso principal, são estimuladas pelas citocinas angiogênicas. Em consequência disso, proteases da matriz extracelular são liberadas pelo endotélio e atuam degradando a lâmina basal. Desta maneira, ocorre migração das células endoteliais para o estroma perivascular, onde se proliferam, iniciando o brotamento capilar. A direção para qual o vaso será formado é norteadada pela fonte dos estímulos angiogênicos. Ao se formar, o broto expande assumindo uma forma tubular e uma nova lâmina basal é instituída. Assim sendo, a proliferação das células endoteliais permite a formação de uma nova cadeia circulatória funcional, pois a extensão dos túbulos microvasculares se unem por anastomose (**Figura 3**) (BENTLEY; CHAKRAVARTULA, 2017; HARMON *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2007).

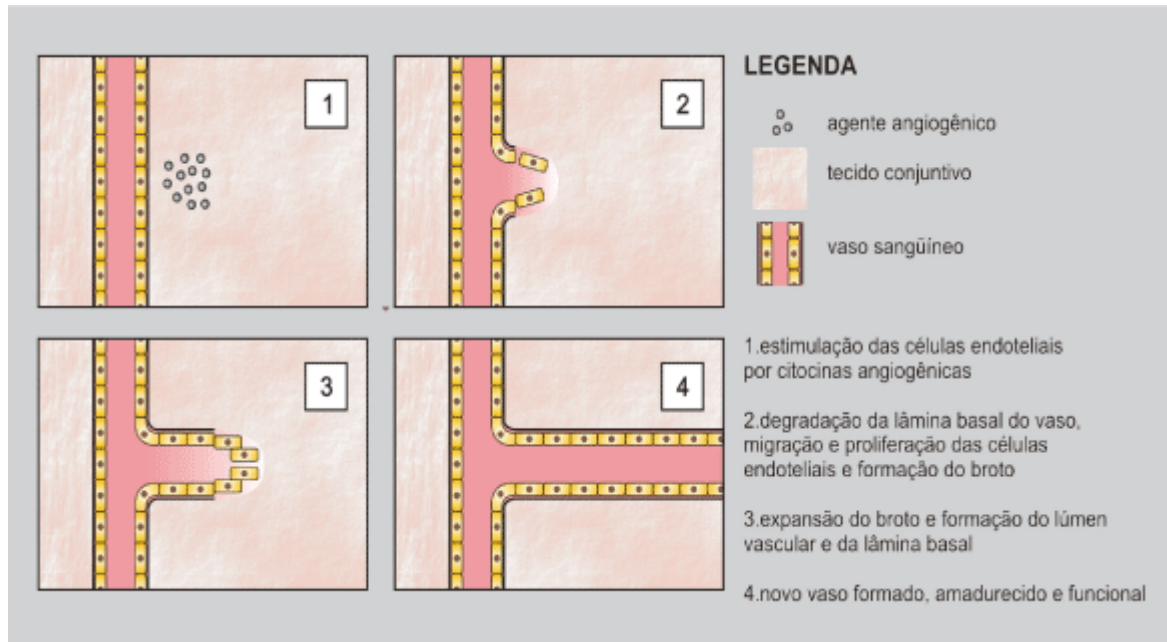


Figura 1 - Representação esquemática do processo de angiogênese. (Adaptado de SILVA, *et al.* 2007.)

2.2.1 Fatores angiogênicos

Os fatores angiogênicos são proteínas circulantes que regulam a angiogênese (SOVIO *et al.*, 2017). A biodisponibilidade de fatores pró-angiogênicos livres é o principal responsável pelo crescimento normal de novos vasos sanguíneos, pois agem nos processos de proliferação, sobrevivência e fenestração de células endoteliais (HERRAIZ *et al.*, 2017).

Os fatores angiogênicos mais importantes, durante a gestação, são: o VEGF e o PIGF. Ambos são proteínas pró-angiogênicas e sua produção é estimulada pela hipóxia. O VEGF é produzido pela decídua materna por linfócitos NK e o PIGF tem efeitos na circulação colateral (MUNDIM *et al.*, 2016). O NO age como um mediador crítico de agentes angiogênicos (HUANG *et al.*, 2012).

Os fatores pró-angiogênicos contribuem para a angiogênese, enquanto fatores antiangiogênicos agem inibindo este processo de formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes (HERRAIZ *et al.*, 2017).

2.2.2 Fator de crescimento placentário (PIGF)

O fator pró-angiogênico, VEGF, atua na proliferação e na sobrevivência das células endoteliais, além de induzir a permeabilidade vascular. O PIGF é homólogo ao VEGF, tendo aproximadamente 50% de equivalência (EHLICH *et al.*, 2017). O PIGF é um resíduo de ácido amínico de glicoproteínas diméricas, possui atividade pró-angiogênica, pró-inflamatória e é liberado pela placenta (GURNADI *et al.*, 2015; LECARPENTIER; TSATSARIS, 2016). O PIGF é expresso predominantemente na placenta, embora seja expresso em baixos níveis em tecidos como: coração, fígado, pulmão, tireoide, músculo esquelético e osso (CHAU; HENNESSY; MAKRIS, 2017). Existem quatro isoformas do PIGF: a PIGF-1, PIGF-2, PIGF-3 e PIGF-4. Durante todo o período de desenvolvimento embrionário, estas isoformas são muito importantes devido à sua participação na vasculogênese (JARDIM *et al.*, 2015).

Na placenta, o PIGF tem sua expressão realizada pelos trofoblastos e sua liberação direta para a circulação materna. Em uma gestação normotensa, durante as 30 primeiras semanas, há aumento de PIGF seguido de sua diminuição. Em mulheres não grávidas, os níveis de PIGF, são muito baixos (JARDIM *et al.*, 2015).

Em tecidos não placentários, o PIGF funciona em resposta a isquemia patológica ou lesão sendo regulado positivamente. Consequentemente, em células não trofoblásticas, o PIGF tem sua expressão aumentada pela hipóxia. Em contrapartida, a atividade transcricional do PIGF é suprimida, no trofoblasto, por hipóxia. E tem sua atividade aumentada em um ambiente com níveis normais de oxigênio (CHAU; HENNESSY; MAKRIS, 2017).

Os fatores angiogênicos ativam dois receptores de fatores de crescimento endotelial presentes nas células endoteliais vasculares: o receptor de domínio de inserção de quinase (KDR) e o receptor tirosina quinase 1 tipo Fms (Flt-1) (LECARPENTIER; TSATSARIS, 2016). O KDR está envolvido na ação do VEGF em células endoteliais, enquanto o Flt-1 atua suprimindo a angiogênese, pois sequestra o VEGF extracelular. O VEGF se liga aos dois receptores, enquanto o PIGF se liga apenas ao receptor Flt-1 ao qual tem alta afinidade, porém menor do que do VEGF. Sendo assim, o PIGF atua pelo deslocamento do VEGF do receptor Flt-1, permitindo o VEGF se ligar ao receptor KDR (LECARPENTIER; TSATSARIS, 2016) O gene Flt-1 tem sua expressão altamente regulada pelos níveis de oxigênio. Em situação de

hipóxia, ocorre regulação positiva do gene Flt-1 e por conseguinte produção predominante da forma solúvel, sFlt-1 (LECARPENTIER; TSATSARIS, 2016).

2.2.3 Tirosina quinase Fms solúvel do tipo 1 (sFlt-1)

A tirosina quinase Fms solúvel do tipo 1 (sFlt-1) trata da forma solúvel do receptor de VEGFR-1 (Flt-1) e atua como antagonista do VEGF e do PlGF. Estes fatores de crescimento são glicoproteínas diméricas secretadas que estão envolvidas nos processos de vasculogênese e angiogênese (EHRlich *et al.*, 2017; LECARPENTIER; TSATSARIS, 2016).

O sFlt-1 é solúvel, está presente na circulação e compreende os domínios extracelulares de fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFR-1/Flt-1). O sFlt-1 age se ligando ao PlGF livre, desta maneira, impede que haja interação do PlGF com os receptores de superfície das células endoteliais, o que contribui para a disfunção endotelial (JIM; KARUMANCHI, 2017). Além disso, em uma gestação considerada normal, o sFlt-1 desempenha importante papel protetor para a placenta e para o feto, pois regula a sinalização excessiva de VEGF que podem causar danos maternos/fetais (FAN *et al.*, 2014).

Várias variantes do sFlt-1 foram descritas na literatura. Elas possuem distribuições diferentes entre os tecidos e são liberadas para a circulação, onde possuem ação antiangiogênica e agem de forma antagonista aos fatores de crescimento, VEGF e PlGF, levando à disfunção endotelial. A variante de sFlt-1, conhecida como sFlt-1 e15a, parece ser exclusivamente secretada pela placenta. Essa variante demonstrou ser biologicamente ativa, sendo capaz de produzir disfunção endotelial, estando aumentada em gestantes com PE e antes do aparecimento dos sintomas (PALMER, K.; TONG; KAITU'U-LINO, 2016).

Na PE, o aumento dos níveis séricos de sFlt-1 ocorre concomitantemente à diminuição dos níveis de PlGF. Pois, ao circular, o sFlt-1, leva a diminuição de níveis de PlGF e VEGF livres no sangue. O VEGF e o PlGF se ligam naturalmente ao Flt-1 e são necessários para o funcionamento adequado das células endoteliais. Porém, com o aumento de níveis de sFlt-1, o VEGF e o PlGF se ligam ao sFlt-1 ao invés de se ligarem ao Flt-1 (**Figura 4**). Por sua vez, o sFlt-1 atua como receptor, mas não traduz os sinais suprimindo os fatores angiogênicos. Desta maneira, o equilíbrio é

deslocado a favor dos fatores angiogênicos resultando em disfunção endotelial (EHRLICH *et al.*, 2017; VERLOHREN; STEPAN; DECHEND, 2012).

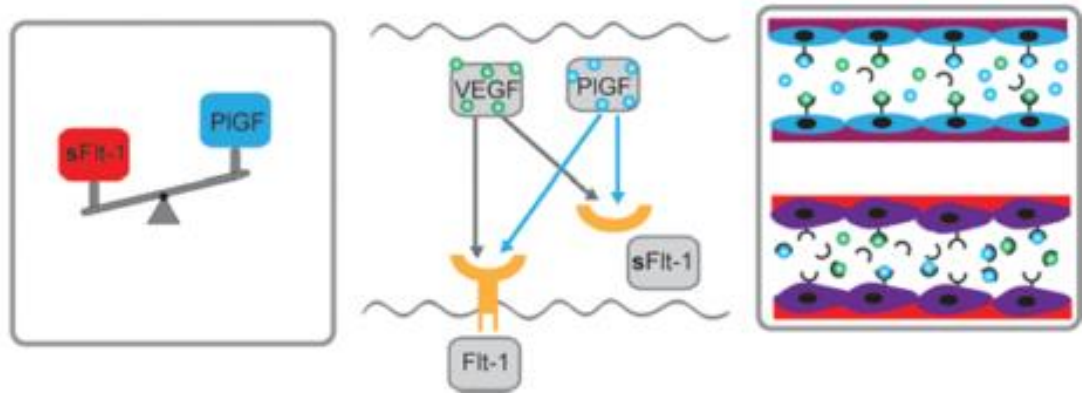


Figura 2 - Representação esquemática da expressão dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos na PE (Adaptado de Verlohren; Stepan; Dechend, 2012).

2.3 Fisiopatologia da pré-eclâmpsia

A PE, muito estudada nos últimos anos, compreende uma doença complexa, com patogênese conhecida parcialmente e etiologia ainda não estabelecida. Admite-se que o desenvolvimento da PE está relacionado principalmente aos distúrbios placentários que ocorrem no início da gestação (MUNDIM *et al.*, 2016; OMS, 2011).

Após a implantação do embrião, os citotrofoblastos invadem o endométrio para viabilizar a implantação placentária. Inicia-se a migração dos sinciotrofoblastos que desencadeiam o remodelamento das artérias espiraladas uterinas (BOELDT; BIRD, 2017). As artérias espiraladas sofrem transformação fisiológica, durante a gestação, de modo que entre as 8^a e 16^a semanas, os trofoblastos invadem o seguimento decidual até um terço do seguimento do miométrio das artérias espiraladas (**Figura 1**). Este processo leva ao remodelamento das artérias convertendo-as em vasos de grande calibre, e baixa resistência, aumentando o fornecimento de sangue para o feto e facilitando a troca de gases e nutrientes (CHAIWORAPONGSA; CHAEMSAITHONG; YEO; *et al.*, 2014; HARMON *et al.*, 2016).

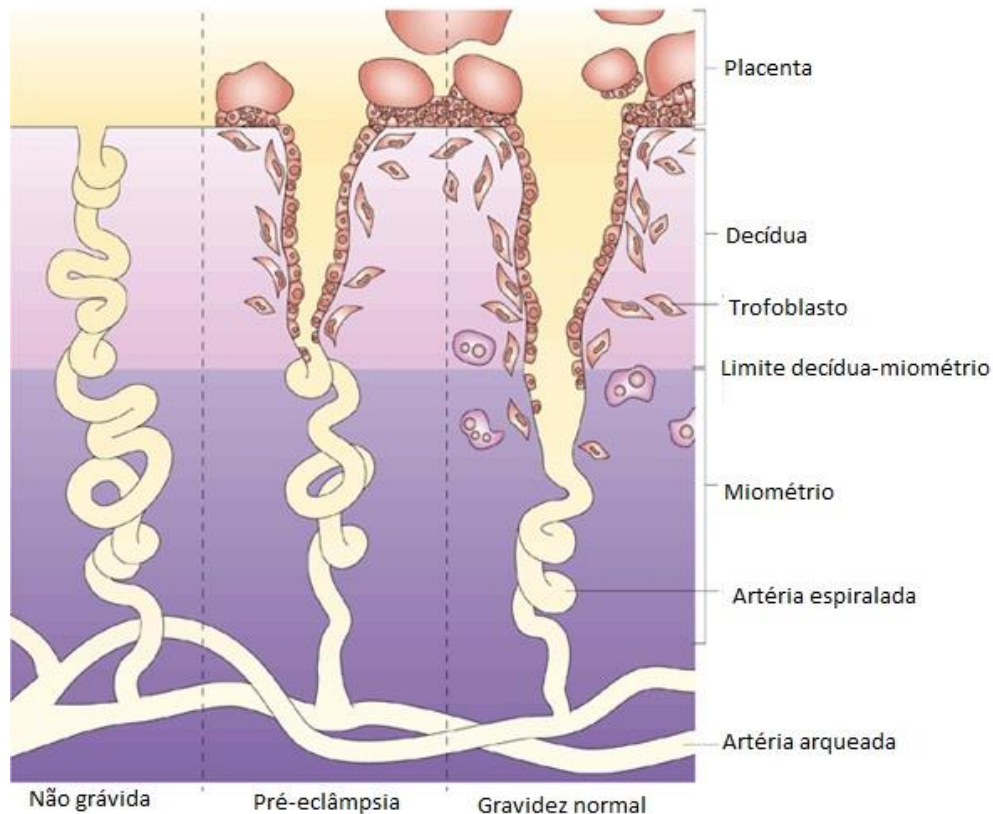


Figura 3 - Comparação da anatomia da artéria espiralada em mulheres não grávidas, gestantes com pré-eclâmpsia e gestantes normais. Representação da invasão de trofoblastos na artéria espiralada durante a gestação (Adaptação: Moffett-king, 2002).

O desenvolvimento anormal da placenta é um dos principais achados fisiopatológicos da PE (LAMBERT *et al.*, 2014). A falha no processo de invasão dos trofoblastos, em gestantes com PE (**Figura 1**), resulta no comprometimento da transformação dos vasos sanguíneos acarretando dificuldade no fluxo progressivo de sangue entre o útero e a placenta, resultando em isquemia placentária. A isquemia provoca estresse oxidativo, inflamação, apoptose e lesão estrutural (LAMBERT *et al.*, 2014). Além disso, a vascularização inadequada leva ao aumento de níveis de fibronectina, agentes pró-trombóticos e aumento da permeabilidade vascular resultando em lesão endotelial progressiva e inflamação generalizada. Estas alterações são provenientes de uma complexa interação entre os fatores genéticos, imunológicos e ambientais (MUNDIM *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo de baixo grau é característico em uma gestação normal. Sabe-se que, durante a gestação, há aumento de níveis circulantes de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas e redução na capacidade antioxidante total. Por volta da 10^a a 12^a semana, o fluxo sanguíneo materno na placenta provoca aumento de oxigênio local e elevação na atividade das enzimas antioxidantes. No entanto, em

gestações com PE, a atividade enzimática antioxidante é diminuída em relação a gestação normotensa (WILLIAMSON *et al.*, 2017). O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e as defesas antioxidantes resulta em estresse oxidativo. O estresse oxidativo relacionado à presença de ROS ocasiona a superprodução de hemoglobina fetal (HbF) e pode ser considerado como um novo fator patológico da PE. Observou-se que a HbF reage de maneira espontânea com o oxigênio gerando radicais livres. A hemoglobina e os produtos de degradação gerados são tóxicos e contribuem para o estresse oxidativo na circulação materna (WILLIAMSON *et al.*, 2017). Os níveis aumentados de ROS causam lesões dos componentes celulares, principalmente DNA, proteínas e lipídeos. As ROS interagem com os lipídeos, aumentando peroxidação lipídica, resultando na disfunção endotelial que tem um papel crucial na patologia dessa doença (WILLIAMSON *et al.*, 2017).

A disfunção endotelial resulta em alteração do tônus vascular, hipertensão, permeabilidade vascular, edema, sobrecarga renal com possível surgimento de proteinúria, aumento de fatores pró-coagulantes e comprometimento de diversos órgãos (NADERI; TSAI; KHANDELWAL, 2017).

A hipertensão e os danos vasculares também podem ser causados pela sensibilidade aumentada, da angiotensina II, aos receptores de tipo 1 (NADERI; TSAI; KHANDELWAL, 2017). Em uma gestação normotensa a angiotensina II é capaz de reduzir a resposta vascular. No entanto, em mulheres com PE, a sensibilidade aos efeitos da angiotensina II é aumentada. A predisposição genética e as respostas imunitárias mal adaptadas a causas ambientais são os mecanismos responsáveis pela sua resposta aumentada durante a PE (HARMON *et al.*, 2016). Em estudos realizados por Wallukat *et al.* (1999), um subgrupo de mulheres com PE apresentou níveis séricos de auto-anticorpos detectáveis contra o receptor de angiotensina II do tipo-1 (AT1). Estes auto-anticorpos atuaram ativando o AT1 em células endoteliais, mesangiais e células do músculo liso vascular (WALLUKAT *et al.*, 1999). Neste mesmo estudo, foi observado que os auto-anticorpos anti-At1, em ratas grávidas, ocasionavam hipertensão, proteinúria, endoteliose capilar glomerular e aumento da produção do receptor de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) solúvel do tipo 1 (sVEGFR-1) e endogлина solúvel (sEng) (WALLUKAT *et al.*, 1999). Os níveis de receptores de AT1 aumentam nos trofoblastos de mulheres com PE. Além disso, a sua ativação ocorre pela geração de angiotensina II placentária que é produzida localmente. Os auto-anticorpos que estimulam a ativação dos receptores AT1,

encontrados em mulheres com PE, são secundários a isquemia placentária, lesões vasculares e resposta inflamatória, e induz, de maneira direta, o aumento da pressão arterial e a proteinúria. Desta maneira, a ativação dos receptores AT1 constituem a consequência e não a causa da PE (FOIDART *et al.*, 2009).

O óxido nítrico (NO) é importante na regulação da resistência vascular, pois é um vasodilatador potente (EHSANIPOOR *et al.*, 2013). Durante a gestação, o NO é responsável, por regular o fluxo sanguíneo placentário, além de participar ativamente do desenvolvimento da placenta e da invasão trofoblástica (LASKOWSKA *et al.*, 2013). O estímulo e liberação de NO pelo endotélio saudável, ocorre em situações de hipoperfusão tecidual. Desta forma, há diminuição do tônus vascular e aumento da perfusão sanguínea na tentativa de reverter à situação de isquemia tecidual (BRANDÃO; CABRAL; CABRAL, 2011). Laskowska *et al.*, 2013, admitem que a diminuição de NO constitui causa potencial do mecanismo fisiopatológico da PE (LASKOWSKA *et al.*, 2013). Sabe-se que a redução de NO está associada a outras doenças de disfunção vascular como a aterosclerose, hipertensão, vasoespasmos cerebral e coronariano, e lesão por isquemia-reperfusão (VIRDIS *et al.*, 2010).

Durante a gestação há um estado de hipercoagulabilidade com risco de ocorrência de eventos tromboembólicos. As alterações que ocorrem neste período estão relacionadas ao aumento dos fatores de coagulação e a diminuição dos níveis de proteínas anticoagulantes, resultando no deslocamento do equilíbrio hemostático a favor do estado de hipercoagulabilidade (HAMMEROVA *et al.*, 2014). Fisiologicamente, alteração na hemostasia em que há estado pró-coagulante na gestação normotensa têm o propósito de prevenir hemorragias excessivas, e até mesmo fatais, durante o parto e o puerpério. No entanto, se desreguladas podem predispor a gestante ao tromboembolismo, especialmente aquelas que possuem um fator predisponente genético. A trombose pode evoluir para embolia pulmonar que constitui a principal causa de mortalidade materna nos países desenvolvidos (HAMMEROVA *et al.*, 2014).

Na PE, antes mesmo do desenvolvimento dos sintomas de hipertensão, pode-se ter trombocitopenia pelo consumo de plaquetas. O aumento plasmático de fator plaquetário, β -tromboglobulina, proteínas específicas de plaquetas (que são armazenados em grânulos alfa e liberadas após a ativação dessas), tromboxano B2 e redução da vida útil das plaquetas são evidências da ocorrência da ativação plaquetária (CHAIWORAPONGSA; CHAEMSAITHONG; YEO; *et al.*, 2014). Tem sido

admitido que os trombos formados na microcirculação de órgãos alvo resultam dessa ativação (CHAIWORAPONGSA; CHAEMSAITHONG; YEO; *et al.*, 2014). Chaiworapongsa *et al.*, 2014, demonstraram que nas gestantes com PE os níveis de prostaciclina endotelial (PGI₂) no sangue e na urina estão reduzidos. Sabe-se que a PGI₂ tem efeito vasodilatador e impede a agregação plaquetária. Dessa forma, especula-se que o consumo das plaquetas pode ser causado pela redução da síntese de PGI₂. Placentas de gestantes com PE tendem a produzir mais tromboxano A₂ que PGI₂, podendo levar a vasoconstrição e a agregação plaquetária (CHAIWORAPONGSA; CHAEMSAITHONG; YEO; *et al.*, 2014). Sabe-se que a diminuição dos níveis de NO resulta em vasoconstrição e aumento da agregação plaquetária. Além da ativação plaquetária exacerbada, na PE, há também aumento dos fatores de coagulação, como o fator VIII, o fator de Von Willebrand (VWF) (ALPOIM *et al.*, 2011).

A gravidez normal é conhecida por apresentar um estado de inflamação leve. Há evidências, fenotípicas e funcionais, de ativação de granulócitos e monócitos circulantes envolvidos em um processo inflamatório discreto (BOELDT; BIRD, 2017; CHAIWORAPONGSA; CHAEMSAITHONG; YEO; *et al.*, 2014). As células imunes e os seus subprodutos interagem com as células endoteliais no processo de invasão trofoblástica. Durante o processo de implantação e estabelecimento da placenta, as células imunes desempenham papel crucial. A camada decídua possui grande quantidade de células imunes, como: células T auxiliares, células *natural killer* (NK), células dendríticas e macrófagos. Essas células são responsáveis pela produção de fatores de crescimento e citocinas. Pode-se destacar: o fator de crescimento placentário (PIGF), o VEGF, o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina (IL) 1 β , IL6, IL8, sendo todos esses fatores importantes no processo de placentação e neovascularização. Além disso, essas substâncias são importantes para o remodelamento vascular a fim de fornecer fluxo sanguíneo adequado ao feto (BOELDT; BIRD, 2017). Estudos demonstraram que no sangue de gestantes, com PE, há aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias em resposta à isquemia placentária, ativação de células T pró-inflamatórias e diminuição de citocinas reguladoras. À medida que a gestação avança o desequilíbrio entre resposta pró e anti-inflamatória aumenta (HARMON *et al.*, 2016). Chaiworapongsa *et al.*, 2014, demonstraram que, em ratas grávidas, a administração de (fator de necrose tumoral) TNF, IL-6 ou IL-17 podem provocar a hipertensão e estresse oxidativo placentário.

Esses pesquisadores admitiram que, embora, a inflamação intravascular seja uma característica da PE, sua presença por si só, não é suficiente para causar a doença (CHAIWORAPONGSA; CHAEMSAITHONG; YEO; *et al.*, 2014). Além disso, infecções e/ou inflamações podem predispor o endotélio deixando-o mais fragilizado aos efeitos negativos das proteínas anti-angiogênicas (NADERI; TSAI; KHANDELWAL, 2017).

Os processos fisiopatológicos que ocorrem na PE podem ser resumidos pela **figura 2:**

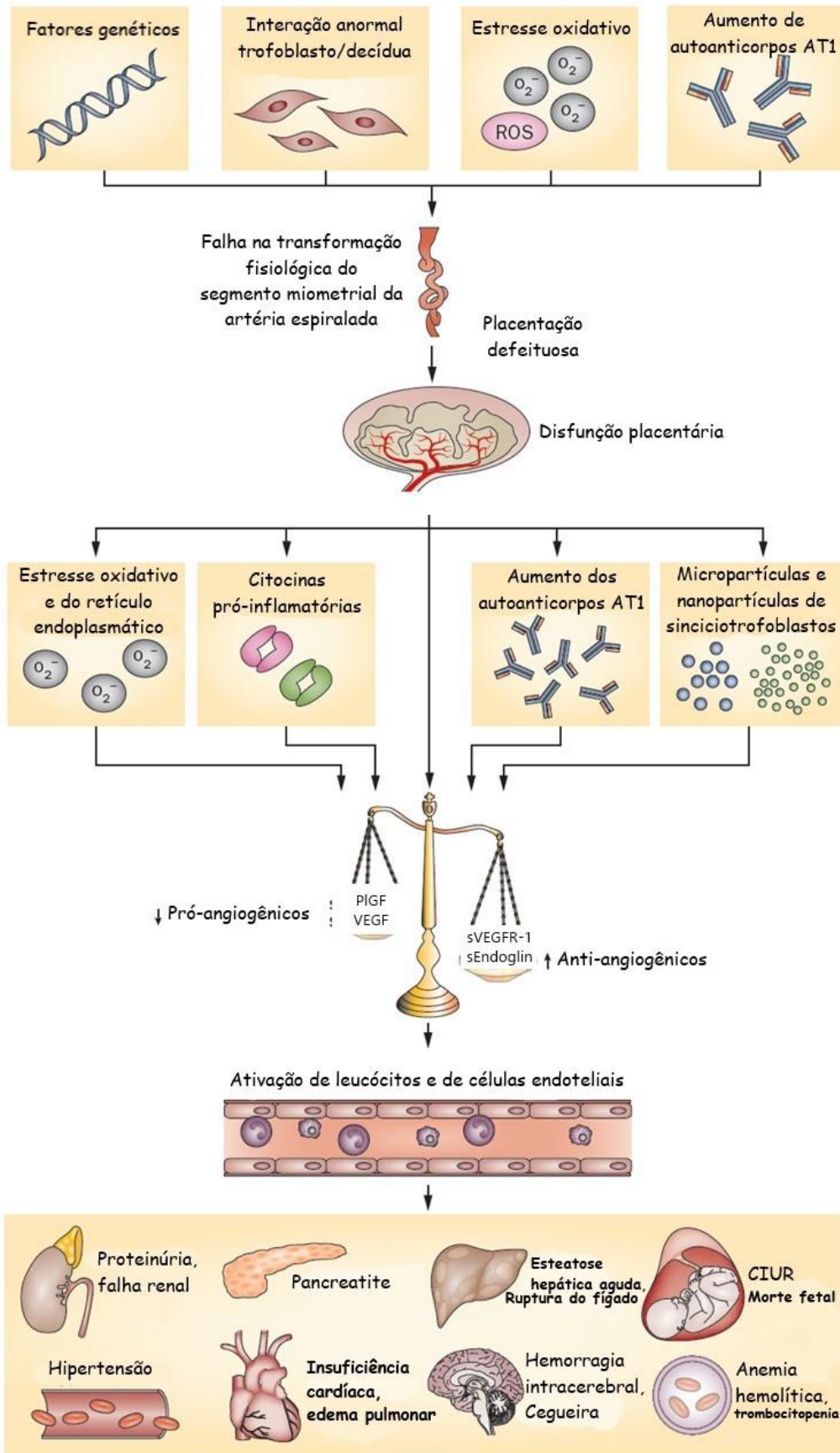


Figura 4 - Representação esquemática da fisiopatologia da PE. (Adaptado de Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. Chaiworapongsa *et al.*, 2014)

Indubitavelmente, a PE pode causar problemas ao feto, pois a placenta tem um papel essencial para o seu crescimento, sendo a responsável pela interface entre a circulação materna e fetal. Dessa forma, a disfunção placentária é responsável pelo CIUR, que está associado ao aumento de risco de parto prematuro, aumento de morbidade, incluindo lesão cerebral causada por hipóxia, doenças cardíacas isquêmicas, obesidade posterior, diabetes e retinopatia devido à prematuridade (HAMMEROVA *et al.*, 2014).

A PE pode acarretar consequências à saúde da mulher, ao longo da sua vida. Jim *et al.*, 2017, relataram que estudos epidemiológicos múltiplos vêm demonstrando que mulheres com história de PE possuem o aumento de risco para o desenvolvimento, no pós-parto e ao longo da vida, de doenças cardiovasculares e acidentes vasculares cerebrais. O impacto da PE na saúde renal não está, ainda, esclarecido. A taxa de albumina urinária foi significativamente maior de 3 a 5 anos, após o parto, em mulheres que tiveram PE. No entanto, após 7 anos, a taxa de filtração glomerular e de creatinina sérica retornaram aos níveis normais, sugerindo que, o impacto na saúde dos rins durante a PE não é duradouro (JIM; KARUMANCHI, 2017). Paradoxalmente, um estudo norueguês revelou frequência significativa de doenças renais terminais, em mulheres com histórico de PE (VIKSE *et al.*, 2008).

Jim *et al.*, 2017, relataram também que as mulheres que tiveram PE precoce apresentaram maior prevalência de alterações da glicemia, insulina, triglicérides e colesterol, e essas alterações surgiram até 3 meses após o parto. O risco de morte também é aumentado em mulheres que tiveram PE de início precoce em comparação às mulheres que não tiveram PE. Dessa forma, tem sido aceito que quanto mais precoce, o aparecimento dos sintomas durante a gestação, maiores são os riscos de problemas de saúde mais graves após o parto. Estes estudos são importantes para traçar estratégias durante e após a gestação objetivando prevenir e tratar maiores complicações que podem ocorrer em ambos os estágios de vida da mulher (JIM; KARUMANCHI, 2017).

2.4 Fatores angiogênicos relacionados à PE

Em uma gestação considerada normal, fatores pró-angiogênicos, como o PIGF e VEGF, são liberados estimulando a síntese de vasodilatadores, como prostaciclina (PGI₂) e NO, promovendo a integridade endotelial (LAMBERT *et al.*, 2014).

Na PE, a isquemia placentária, resulta na liberação de fatores antiangiogênicos ocasionando um desequilíbrio em seus níveis (LAMBERT *et al.*, 2014). O desequilíbrio de fatores antiangiogênicos e angiogênicos é um importante mecanismo de ocorrência de disfunção endotelial na PE (EHLICH *et al.*, 2017).

Segundo Erlich *et al.* 2017, há evidências de que a tirosina quinase solúvel (sFlt-1) que é um fator antiangiogênico e o PIGF, um fator angiogênico, são importantes no desenvolvimento de PE e CIUR (EHLICH *et al.*, 2017).

Sabe-se que a placenta tem papel fundamental no desenvolvimento da PE e condições como aumento da massa placentária, gestações múltiplas e molares, aumentam a expressão de sFlt-1 e com isso apresentam elevado risco dessa doença. Em estudo realizado, por Palmer *et al.* (2016), a maioria das mulheres com PE tiveram valores aumentados de sFlt-1, em sua circulação, apresentando também níveis dramaticamente diminuídos após 48 horas do parto. Desta forma, a hipótese de que a placenta é a principal fonte de sFlt-1 na PE pode ser confirmada. Porém, apesar da forte evidência da associação desses níveis elevados com a PE não é vista de forma uniforme em todos os casos estudados. Isso se relaciona, potencialmente, com a heterogeneidade de mecanismos pelos quais a PE pode ocorrer (PALMER, K.; TONG; KAITU'U-LINO, 2016).

A sEng antagoniza o fator de crescimento transformante beta (TGF- β) e bloqueia a síntese de NO (LAMBERT *et al.*, 2014). A redução da perfusão placentária devido a invasão vascular deficiente, na PE, resulta em hipóxia crônica e CIUR. Devido a hipóxia, a placenta produz fatores antiangiogênicos como: sFlt-1 e sEng; e pró-angiogênicos como: TGF- β 1 e TGF- β 3. Ao passar para a circulação materna provoca disfunção endotelial, hipertensão e proteinúria (JARDIM *et al.*, 2015).

Segundo Jardim *et al.* (2015) foram encontrados, em gestantes com PE, níveis mais elevados de sEng na PE grave ao comparar com pacientes com PE leve. Uma correlação positiva entre sEng e os marcadores inflamatórios foi associada, de maneira individual, à gravidade da doença (JARDIM *et al.*, 2015). Um estudo realizado por Sugimoto *et al.* (2003) encontrou níveis plasmáticos sFlt-1 e sEng aumentados

não só no início dos sintomas, mas em semanas antes desses sintomas aparecerem (SUGIMOTO *et al.*, 2003).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa, encontrou níveis aumentados de sEng e molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e diminuição dos níveis de VEGF livre no plasma de mulheres com PE grave, em comparação à gestantes normotensas, confirmando o fato de que na PE ocorre o desequilíbrio entre fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos e VCAM-1. Estes resultados suportam a hipótese de que alteração no balanço angiogênico e a disfunção endotelial têm um papel biológico importante na PE (RIOS *et al.*, 2016).

O marcador pró-angiogênico, PIGF, circula em altas concentrações na circulação de grávidas normotensas. Na PE há aumento de sFlt-1 pela placenta, em resposta às alterações oxidativas e inflamatórias, que se liga ao PIGF circulante. Desta forma, os níveis circulantes de PIGF, não ligado, são diminuídos havendo provas consistentes de elevada correlação entre os níveis diminuídos de PIGF e mulheres com PE (MATHUR *et al.*, 2016).

Poucos autores já estudaram o uso do fator angiogênico, em estudos longitudinais, como biomarcador e apenas alguns conseguiram demonstrar o seu uso em casos já estabelecidos. Desta maneira, uma adequação no estudo destes biomarcadores para serem utilizados na clínica é muito importante. Baixos valores de PIGF são significativos no prognóstico para a progressão rápida de complicação materna e risco fetal. Além disso, o entendimento da alteração de VEGF, sFlt-1 e PIGF em pacientes com PE pode promover novas opções de terapêuticas utilizadas. A possibilidade de se detectar pacientes que desenvolverão PE precocemente, visto que o diagnóstico é possível após 20 semanas, permite a tomada de medidas mais rápidas e preventivas de forma a melhorar o prognóstico materno e perinatal (MATHUR *et al.*, 2016).

Atualmente, sugere-se, o PIGF e o seu receptor Flt-1 como marcadores angiogênicos com grande potencial para o diagnóstico da PE, pois essa doença está associada aos níveis maternos diminuídos de PIGF e aumentados de sFlt-1. Eles apresentam melhor precisão diagnóstica por estarem próximos à patologia placentária primária, que é considerada a principal causa do surgimento da PE. Além disso, acredita-se que estes marcadores possuem a possibilidade de prever a gravidade da PE, visto que há maiores alterações de PIGF nas gestantes com PE precoce se comparadas com as gestantes de PE tardia e gestantes normotensas. Essa possível

possibilidade de distinção entre os tipos de PE aumenta a precisão do prognóstico ao associar com os outros sinais encontrados (MATHUR *et al.*, 2016).

A avaliação dos níveis plasmáticos de PIGF, em comparação ao sFlt-1, parece ser mais confiável e mais específica para se usar como biomarcadores, pois a queda precoce deste marcador no soro ocorre bem antes do aparecimento dos primeiros sintomas (MATHUR *et al.*, 2016). Esses fatores parecem ser bons marcadores para prever o início da PE e suas complicações (LECARPENTIER; TSATSARIS, 2016).

Nos primeiros meses, de gestação, o PIGF, combinado a outros marcadores clínicos e biológicos pode ser capaz de prever o início da PE. No segundo e terceiro trimestres a relação entre os níveis de sFlt-1 e PIGF tem-se mostrado uma possível ferramenta de triagem para prever a ocorrência da PE e determinar quais as melhores medidas de controle dos sintomas. Desse modo, muitos estudos tem sido feitos a fim de avaliar a razão sFlt-1/PIGF para consolidá-lo como biomarcador na prática clínica durante o pré-natal para melhorar o diagnóstico e prognóstico das pacientes (LECARPENTIER; TSATSARIS, 2016).

Estudo realizado por Teixeira *et al.* 2008 determinou níveis plasmáticos de PIGF e VEGF, entre 33 e 35 semanas de gestação, em 23 gestantes com PE e 9 gestantes normotensas. O PIGF se comportou como melhor preditor de PE, tendo em visto que foi 12 vezes menor em gestantes com PE em comparação com gestantes normotensas, o VEGF não apresentou diferenças significativas. Além disso, conseguiu-se observar que o PIGF possui uma inversa correlação com a pressão arterial sanguínea média (TEIXEIRA *et al.*, 2008).

Segundo Teixeira *et al.* 2013, estudo realizado com 74 gestantes das quais 12 desenvolveram PE. A avaliação do PIGF sozinho melhora a precisão diagnóstica na predição da PE durante o segundo trimestre da gestação e aparenta ser eficaz na predição da PE antes do aparecimento dos sintomas. No entanto, devido ao desequilíbrio acentuado, entre os fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos, e a grande importância desses fatores na patologia dessa doença, o melhor marcador preditivo potencial é a razão sFlt-1/PIGF (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

O estudo longitudinal realizado por Ohkuchi *et al.* (2010), avaliou 144 amostras sanguíneas de gestantes normotensas e 34 de mulheres com PE em 3 momentos: 19-25, 27-31 e 34-38 semanas de gestação. Desta forma, observou-se que as curvas de intervalo de referência utilizadas para avaliar os níveis plasmáticos de sFlt-1, PIGF e a relação entre sFlt-1/PIGF são potenciais para a predição tanto da PE de início

precoce, quanto a PE de início tardio. Além disso, para a relação entre sFlt-1/PIGF o valor de corte de 45 apresentou melhor especificidade e sensibilidade para o diagnóstico da PE independente do seu tipo (OHKUCHI *et al.*, 2010). Neste contexto, cumpre ressaltar a importância do presente estudo em que esses marcadores foram avaliados longitudinalmente e inclusive no primeiro trimestre da gestação (12 a 19 semanas), momento em que a placentação ocorre mais intensamente.

Nejabati *et al.* (2017), realizou um estudo incluindo 96 gestantes, das quais 58 foram classificadas com PE e 38 com risco de desenvolvimento de CIUR. Os níveis de PIGF avaliados podem propor, segundo esse estudo, que o PIGF é útil para determinar o diagnóstico clínico precoce e prever a gravidade associada a PE. Porém, Nejabati *et al.*, propõem um estudo envolvendo juntamente com a análise das taxas de PIGF, a análise de sFlt-1 e a razão entre sFlt-1/PIGF para predizer de forma mais completa o diagnóstico (NEJABATI *et al.*, 2017). O presente estudo objetiva responder as questões estabelecidas por Nejabati *et al.*

Segundo JIM *et al.* (2017), a administração de sFlt-1 em ratas grávidas induziu o aparecimento de traços marcantes da PE, como por exemplo hipertensão, dano de endotélio glomerular e proteinúria (JIM; KARUMANCHI, 2017). Além disso, como o VEGF induz a formação de NO, que possui ação neutralizadora de ROS e tem ação vasoconstritora, o excesso de sFlt-1 leva a diminuição de NO pelo sequestro de VEGF, impedindo que esse atue fisiologicamente (JIM; KARUMANCHI, 2017).

Em estudos realizados por Zeisler *et al.* (2016), em mulheres com suspeita de PE, a relação entre sFlt-1/PIGF foi considerada indicador para a duração da gestação. Quando esta relação está acima de 38 indica que a gestação poderá ser mais curta do que as gestantes que apresentam esta relação igual ou menor a 38. Desta maneira, acredita-se que valores acima de 38 definem um desfecho potencialmente negativo para essas mulheres, pois indicam uma menor duração gestacional e parto pré-maturo, independente das gestantes terem desenvolvido PE. Porém, observou-se que em mulheres com PE, as correlações entre a relação sFlt-1/PIGF e o parto pré-maturo foram mais evidentes (ZEISLER *et al.*, 2016).

Em estudo de revisão realizado por Zhao *et al.* (2017), foram avaliados primeiramente cerca de 2.421 artigos, desses foram separados 141 após triagem para a realização da revisão. Nesse estudo, sugere-se que a proporção entre sFlt-1/PIGF pode ser utilizada para diagnóstico. No entanto, alguns estudos não determinaram uma relação ao ponto de corte para o diagnóstico de PE e de outros distúrbios

hipertensivos que ocorrem durante a gestação. Já outros estudos demonstraram que seria necessário mais de um ponto de corte para um diagnóstico mais preciso. Porém, determinar uma faixa de resultados que satisfaça a especificidade e a sensibilidade, relacionada à PE, ainda não foi precisamente possível. Sendo assim, ainda faltam estudos mais amplos que sejam capazes de satisfazer de forma adequada OS intervalos gestacionais em que a interação entre os índices de relação sFlt-1/PIGF atenda o diagnóstico dos diferentes tipos de PE (ZHAO *et al.*, 2017).

Entre os anos de 2011 e 2015, Nanjo *et al.* (2017) e sua equipe de pesquisa, realizaram um estudo com 165 mulheres gestantes. Essas mulheres foram separadas em dois grupos: gestantes com hipertensão (n=91) e gestantes normotensas (n=74). As gestantes com hipertensão foram subdivididas em grupo com proteinúria (n=72) e grupo sem proteinúria (n=19). Esse estudo demonstrou que os níveis dos fatores angiogênicos circulantes mensurados imediatamente antes do parto estão correlacionados aos transtornos hipertensivos durante a gravidez, bem como com a sua gravidade. Sendo assim, o perfil desses marcadores específicos contribui para melhor compreensão e predição das condições clínicas individuais e sua patogênese (NANJO *et al.*, 2017).

Esses estudos são recentes e possuem muitos pontos de importância que não foram totalmente elucidados. Por apresentar resultados promissores para o diagnóstico, da PE, a relação entre sFlt-1/PIGF necessita de maiores informações e mais estudos para que estes fatores angiogênicos possam ser consolidados na prática clínica. Portanto, a identificação de biomarcadores da PE, presentes no início da gravidez, permitirá a segmentação adequada do risco associado àquela gestação, o que possibilitará a adoção de medidas terapêuticas específicas e necessárias. Assim, a intervenção clínica individualizada e precoce certamente contribuirá para o maior êxito da gestação, com conseqüente diminuição do gasto do poder público com internação prolongada da gestante e do recém-nascido, bem como com a redução de morbimortalidade materna e perinatal.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os níveis plasmáticos dos fatores angiogênicos, sFlt-1 e PlGF, como biomarcadores da pré-eclâmpsia em dois estudos: transversal e longitudinal.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar em gestantes com PE grave e em gestantes normotensas, no terceiro trimestre de gestação, os níveis plasmáticos de sFlt-1, PlGF e a razão sFlt-1/PlGF.
- Determinar em gestantes com PE grave, nas formas precoce e tardia, os níveis plasmáticos de sFlt-1, PlGF e a razão sFlt-1/PlGF.
- Determinar em gestantes portadoras de fatores de risco para PE, que desenvolveram ou não a doença, em quatro períodos da gestação (12 a 19 semanas, 20 a 29 semanas, 30 a 34 semanas e 35 a 40 semanas), os níveis plasmáticos de sFlt-1, PlGF e a razão sFlt-1/PlGF.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

4.1.1 Aspectos éticos

Este estudo constitui um sub-projeto do projeto “Hemostasia: Interrelação dos sistemas hemostático e inflamatório”, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – ETIC 0530.0.203.00-09 (**ANEXO A**) e ETIC 0618.0.203.000-10 (**ANEXO B**).

4.1.2 Seleção das integrantes do estudo

Para o presente trabalho foram utilizadas amostras de sangue anteriormente coletadas, em dois modelos de estudo, transversal e longitudinal como descrito a seguir:

4.1.2.1 Estudo transversal:

Este estudo incluiu amostras de gestantes com PE grave e amostras de gestantes normotensas coletadas no terceiro trimestre de gestação. As gestantes com PE grave (n=39) foram selecionadas, no Hospital Público Regional de Betim (HPRB) e na Maternidade Odete Valadares (MOV). As gestantes normotensas (n=43) foram selecionadas na Unidade Básica de Saúde da Família (UBSF) Guanabara/Betim, como mostra **figura 5**. As gestantes de ambos grupos foram pareadas conforme a idade. O cartão pré-natal e/ou o prontuário médico foram utilizados para obtenção dos dados clínicos e laboratoriais de interesse.

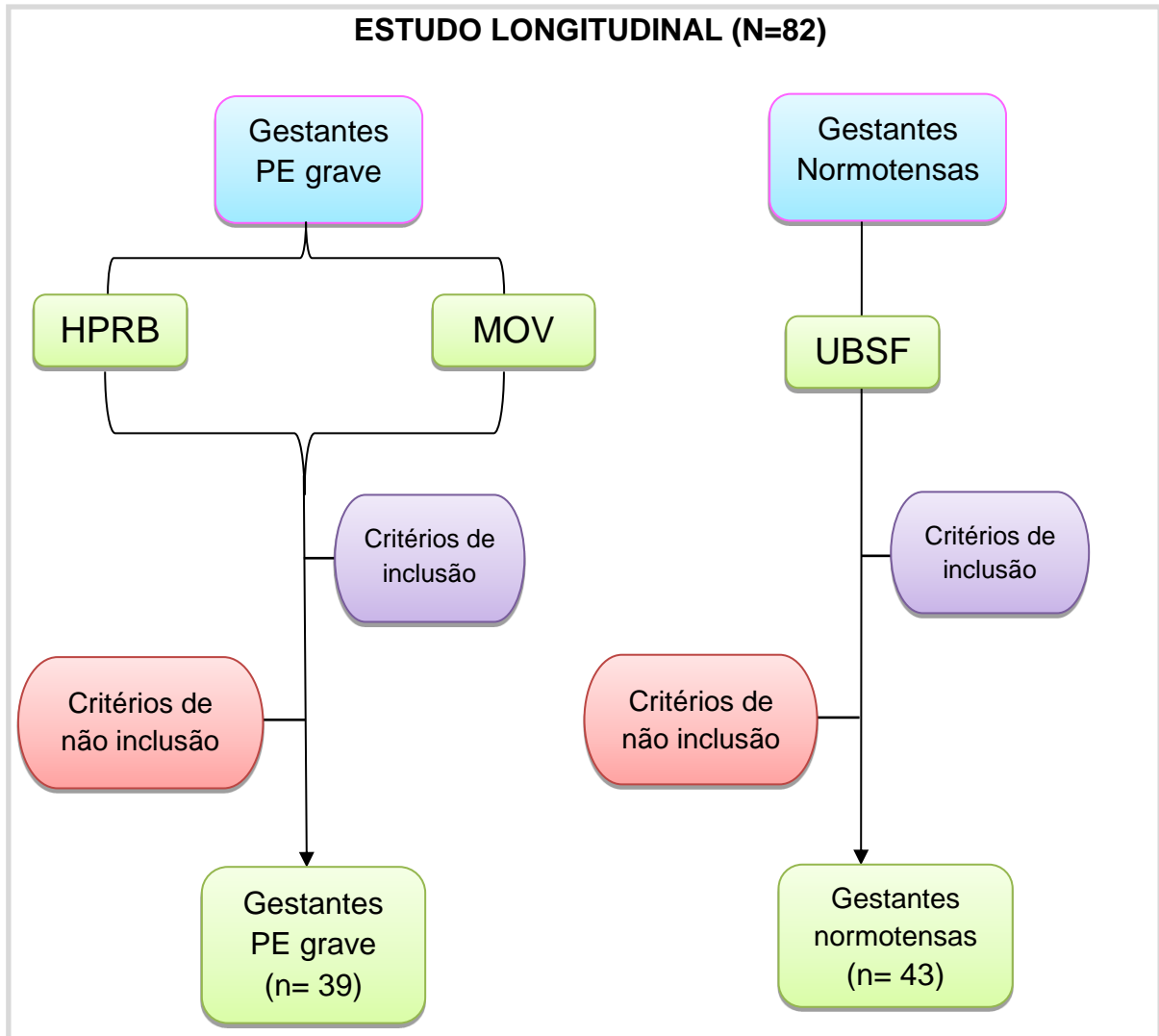


Figura 5 - Fluxograma de seleção das gestantes para o estudo transversal.

HPRB: Hospital Público Regional de Betim

MOV: Maternidade Odete Valadares

UBSF: Unidade Básica de Saúde da Família Guanabara/Betim

O grupo de gestantes com PE grave foi posteriormente dividido, de acordo com a idade gestacional em que surgiram os sintomas clínicos, em PE precoce (IG < 34 semanas) e PE tardia (IG ≥ 34 semanas).

4.1.2.1.1 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão para de gestantes com PE foram:

- Mínimo de dois episódios, medidos em um intervalo de quatro horas, de pressão sistólica/diastólica ≥ 160mmHg e/ou 110mmHg e/ou;

- Proteinúria superior a 2g em urina de 24 horas e/ou maior que (+ +), conforme protocolo clínico adotado nas maternidades, em amostras isoladas e/ou;
- Sintomas (escotoma, cefaleia, epigastralgia, aumento ou abolição dreflexo patelar);

O diagnóstico de PE grave foi determinado pelas equipes obstétricas das maternidades envolvidas no estudo.

Para o grupo de gestantes normotensas (controle), os critérios de inclusão utilizados foram:

- Pressão sistólica/diastólica \leq 120/80mmHg e sem qualquer histórico de hipertensão ou PE;
- Ausência de relato de proteinúria proteinúria;

4.1.2.1.2 Critérios de não inclusão

Para ambos os grupos, os critérios de não inclusão foram:

- Gestação múltipla
- Obesidade
- Presença de doenças intercorrentes como: doenças cardiovasculares, doenças renais, doenças hepáticas, doenças autoimunes, distúrbios da coagulação, diabetes e câncer
- Trabalho de parto avançado
- Presença de sangramento de qualquer natureza

4.1.2.1.3 Amostra biológica

Foram coletadas de cada participante do estudo, 5mL (mililitros) de sangue venoso, em tubos do sistema *BD Vacuiter*[®] (*Becton Dickinson*) contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), devidamente identificados.

As amostras foram centrifugadas a 3000 rotações por minuto (rpm), durante 10 minutos. O plasma foi transferido para tubos criogênicos, que foram armazenados em freezer a -80 graus celsius (°C) até o momento da realização dos testes laboratoriais.

4.1.2.2 Estudo longitudinal

Este estudo incluiu amostras de sangue de 28 gestantes, que apresentavam fatores de risco para o desenvolvimento da PE, selecionadas no ambulatório de alto risco do Centro de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas da UFMG.

As gestantes foram distribuídas em dois grupos:

- Grupo I (n=11): Gestantes que desenvolveram PE
- Grupo II (n=17): Gestantes que não desenvolveram PE

A coleta de sangue foi feita em quatro momentos da gestação: de 12 a 19 semanas, de 20 a 29 semanas, de 30 a 34 semanas e 35 semanas ou mais, como mostra a **figura 6**.

O prontuário médico foi utilizado para a coleta de dados clínicos e laboratoriais.

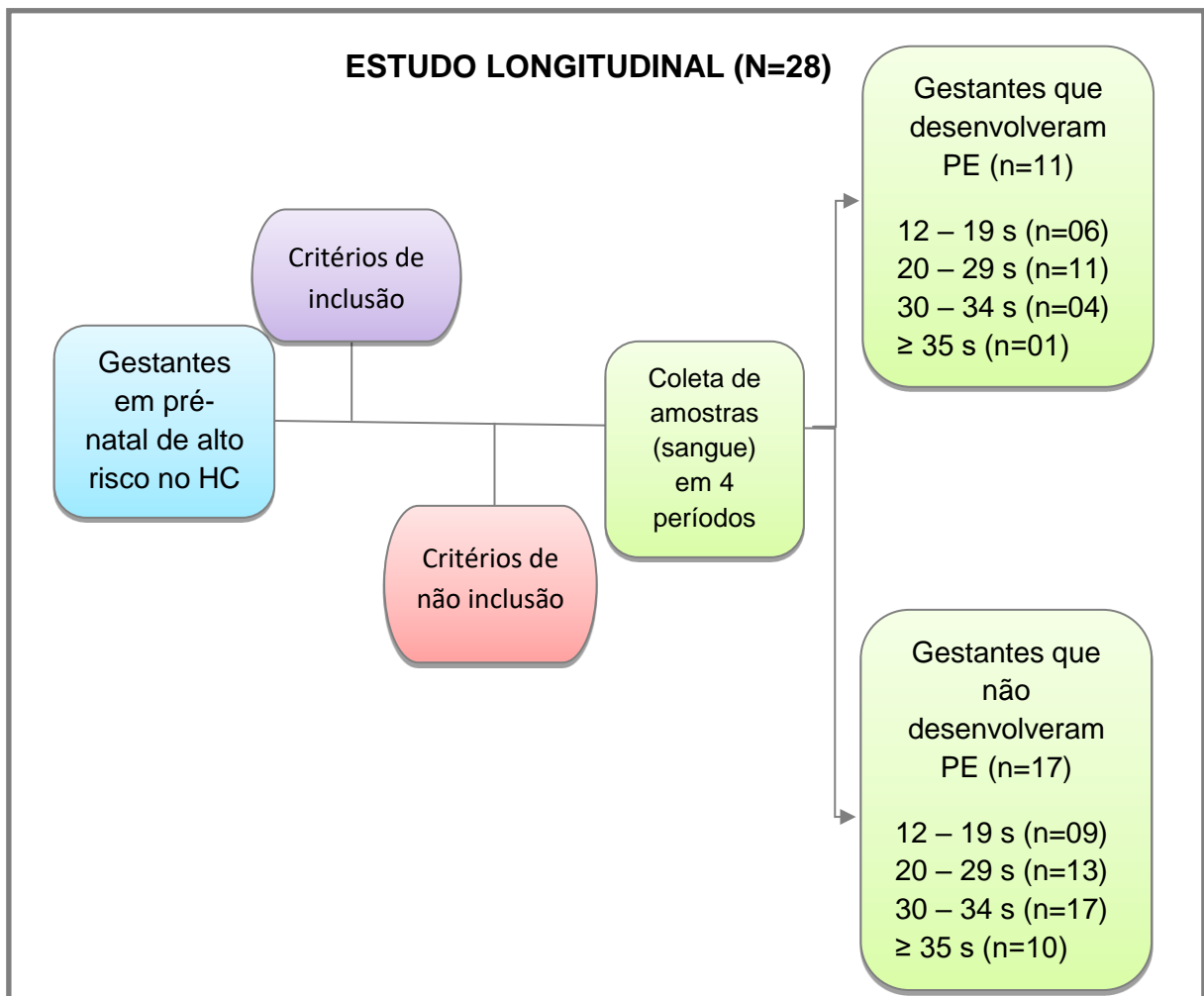


Figura 6 - Fluxograma de seleção das gestantes para o estudo longitudinal.

PE: pré-eclâmpsia; HC: Hospital das Clínicas; s: semanas.

4.1.2.2.1 Critérios de inclusão

As participantes selecionadas para o estudo apresentavam pelo menos dois dos critérios de inclusão a seguir:

- Histórico de PE em gestação anterior
- Primipaternidade
- Etnia não branca
- Hipertensão prévia
- Limite extremo da idade fértil (<18 anos ou maior que 35 anos na primeira gravidez).

O diagnóstico de PE foi estabelecido com base nos seguintes critérios:

- Mínimo de dois episódios, medidos em um intervalo não inferior a 4 horas, de pressão sistólica/diastólica $\geq 140\text{mmHg}$ e/ou 90mmHg e/ou;
- Valor superior a $0,3\text{g/L}$ de proteínas em amostra de urina de 24 horas e/ou maior que (+) em amostras isoladas pelo método semi-quantitativo de fita e/ou;
- Sintomas clínicos como: distúrbios visuais, dor abdominal, vômitos e náuseas.

4.1.2.2.2 Amostra biológica

Foram coletadas de cada participante do estudo, 5mL de sangue venoso, em tubos do sistema *BD Vacuiter*[®](*Becton Dickinson*) contendo EDTA, devidamente identificados.

As amostras foram centrifugadas a 3000rpm, por 15 minutos, em temperatura ambiente. O plasma foi transferido para tubos criogênicos, que foram armazenados em freezer a -80°C até o momento da realização dos testes laboratoriais.

A coleta de sangue de cada participante do estudo foi realizada em quatro períodos da gestação

- 12 a 19 semanas
- 20 a 29 semanas
- 30 a 34 semanas
- 35 a 40 semanas

4.2 Métodos

A determinação dos níveis plasmáticos de PIGF e sFlt-1, tanto do estudo transversal como do longitudinal, foi feita pelo ensaio imunoenzimático *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) sanduíche.

4.2.1 Determinação de PIGF

Para a determinação dos níveis plasmáticos de PIGF foi utilizado o conjunto diagnóstico *Cusabio*[®], seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

Nos poços da microplaca estão fixados anticorpos específicos anti-PIGF. Qualquer quantidade de PIGF presente nas amostras de plasma, ou nos padrões, se liga ao anticorpo imobilizado na placa. Lavagens sucessivas foram realizadas a fim de remover substâncias não específicas e que não estão ligadas. Após a remoção destes interferentes, foi adicionado aos poços um anticorpo específico para PIGF conjugado com biotina. Lavagens foram realizados novamente para remover anticorpos que não ligaram e foi adicionada a cada poço, avidina, conjugada com *horseradish* peroxidase (HRP). Lavagens foram realizadas novamente a fim de retirar qualquer excesso de anticorpo que possa estar presente nos poços. O substrato, tetrametilbencidina (TMB), foi adicionado e, ao ser catalisado pela HRP, ocorreu o aparecimento de cor. A intensidade da cor é proporcional a quantidade de PIGF presente nas amostras, ou seja, quanto mais intensa a cor, maior a concentração de PIGF.

A leitura das reações foi feita pelo leitor de microplacas *VersaMax Microplate Reader – Molecular Devices Estados Unidos da América* (EUA) considerando o comprimento de onda de 450 nanômetros (nm). Para a determinação da concentração de PIGF utilizou-se a curva-padrão gerada pelo software incluso no leitor.

As amostras foram diluídas a 1:3,33 ou 1:2 e o resultado multiplicado por 3,33 e 2 respectivamente. Segundo o fabricante, a faixa de referência é 31,25 picogramas por mililitro (pg/mL) a 2000pg/mL e o teste apresenta sensibilidade de cerca de 7,81pg/mL.

4.2.2 Determinação de sFlt-1

Para a determinação dos níveis plasmáticos de sFlt-1 foi utilizado o conjunto diagnóstico da *Novatembio*[®], seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

O princípio do teste de determinação dos níveis de sFlt-1 é o mesmo para PIGF. A intensidade da cor é proporcional à quantidade de sFlt-1.

A leitura das reações foi realizada no aparelho de leitura de ELISA *VersaMax Microplate Reader – Molecular Devices* (EUA) em comprimento de onda de 450nm.

As amostras também foram diluídas a 1:3,33 ou 1:2 e o resultado multiplicado por 3,33 e 2 respectivamente. Segundo o fabricante, a faixa de referência é de 156pg/mL a 1000pg/mL e o teste apresenta sensibilidade de cerca de 4pg/mL.

4.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS (versão 19.0). A normalidade dos dados foi testada pelo teste *W* de *Shapiro-Wilk*. A comparação das variáveis contínuas com distribuição normal foi realizada pelo teste *t* *Student*. As características clínicas dos participantes foram comparadas pelo teste *t* de *Student* (para dados paramétricos) ou pelo teste *U* de Mann-Whitney (para dados não paramétricos). Os dados paramétricos são apresentados como média \pm desvio padrão (DP) e dados não paramétricos como mediana (intervalo interquartilico). não normais foi feita pelo método de *Mann-Whitney*. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal foi utilizado o *test-t*. A comparação dois a dois no estudo longitudinal foi feita pelo teste Mann Whitney com correção de Bonferroni ($p < 0,017$). A análise GLM bivariável foi realizada a fim de avaliar se PIGF, sFlt-1 e sFlt-1/PIGF (variáveis dependentes) foram influenciadas pelo desfecho gestacional dos fatores fixos (gravidez pré-eclâmptica *versus* normotensa), período gestacional ou pela interação desses fatores, uma transformação Log10 foi usada para normalizar os dados de PIGF e sFlt-1. Para analisar os dados do estudo transversal empregou-se o programa R (Core Team, 2014, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>).

O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para ambos os estudos.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo transversal

5.1.1 Características clínicas

As características clínicas das participantes dos grupos, de gestantes com PE e gestantes normotensas, avaliados no estudo transversal estão mostradas na **tabela 1**.

Tabela 1 - Características clínicas das gestantes participantes do estudo transversal.

Características clínicas	Gestantes PE grave (n = 39)	Gestantes Normotensas (n = 43)	p
Idade (anos)	27 (12)	23 (12)	0,159
IG (sem)	32 (4)	33 (7)	0,062
IMC (Kg/m ²)	22,5(6,3)	23 (4,8)	0,957
GPG (Kg)	11,60 (5,8)	10 (6,3)	0,434
PA sist. (mmHg)	170,0 (20)	110,0 (20)	< 0,001*
PA diast. (mmHg)	100,0 (10)	70,0 (10)	< 0,001*
Proteinúria (g/24h)	2,2(4)	-	-

IG: idade gestacional coleta; sem: semanas; IMC: índice de massa corporal; GPG: ganho de peso na gestação; PA: pressão arterial; sist: sistólica; diast: diastólica.

Os dados não-paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil) (Mann-Whitney).

*p<0,05.

Os dados clínicos de ambos os grupos foram obtidos de prontuários médicos, do cartão pré-natal e por entrevista. Os parâmetros como idade, idade gestacional e o índice de massa corporal (IMC) não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos.

O ganho de peso na gestação não apresentou diferença entre os grupos (p=0,434). Os valores de pressão arterial sistólica e da pressão diastólica foram maiores nas gestantes com PE grave, comparando-se com as normotensas (p=<0,001 para ambos). Estes valores já eram esperados por se tratar de um dos critérios de inclusão do estudo.

5.1.2 Avaliação dos níveis plasmáticos de PIGF e sFlt-1 nas gestantes com PE grave e nas gestantes normotensas

Os níveis de sFlt-1 foram maiores nas gestantes com PE grave ao se comparar às gestantes normotensas ($p < 0,001$). Para os níveis de PIGF, não foi obtida diferença significativa comparando-se os dois grupos. A razão de sFlt-1/PIGF mostrou resultados significativos, tendo valores maiores em gestantes com PE grave, ao comparar os dois grupos ($p = 0,009$) como mostra a **tabela 2**.

Tabela 2 - Níveis plasmáticos de PIGF e sFlt-1 nas gestantes com PE grave e nas gestantes normotensas do estudo transversal.

GESTANTES PE GRAVE n=39			GESTANTES NORMOTENSAS n=43			p		
sFlt-1 pg/mL (n=39)	PIGF pg/mL (n=34)	sFlt-1/ PIGF (n=34)	sFlt-1 pg/mL (n=39)	PIGF pg/mL (n=38)	sFlt-1/ PIGF (n=38)	sFlt-1	PIGF	sFlt-1/ PIGF
25501,8 (5963,7)	76,2 (137,4)	334,9 (579,8)	8846,3 (6834,8)	59,0 (88,3)	155,8 (270,0)	<0,001*	0,094	0,009*

Os dados não-paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil) (Mann-Whitney).

* $p < 0,05$

Uma segunda comparação dos níveis plasmáticos de PIGF e sFlt-1 foi feita após dividir o grupo de gestantes com PE grave, de acordo com a idade gestacional em que surgiram os sintomas clínicos, em PE precoce (IG <34 semanas) e PE tardia (IG \geq 34 semanas).

As concentrações de sFlt-1 foram maiores na PE precoce e tardia em relação às gestantes normotensas ($p < 0,001$ para ambos), não apresentando diferença entre PE precoce e PE tardia. A razão sFlt-1/PIGF também apresentou valores significativos (maiores entre as gestantes com PE e as normotensas ($p = 0,022$)). Não foram obtidas diferenças significativas comparando-se os valores de PIGF entre as gestantes com PE precoce, tardia e normotensas ($p = 0,197$), apesar disso, a razão sFlt-1/PIGF foi maior em gestantes com PE precoce em relação as normotensas ($p = 0,008$), como mostrado na **tabela 3**.

Tabela 3 - Níveis plasmáticos de PIGF e sFlt-1 nas gestantes com PE precoce, com PE tardia e nas gestantes normotensas do estudo transversal.

GESTANTES PE PRECOCE n=28			GESTANTES PE TARDIA n=11			GESTANTES NORMOTENSAS N=43			p		
sFlt-1 pg/mL (n=28)	PIGF pg/mL (n=24)	sFlt-1/ PIGF (n=24)	sFlt-1 pg/mL (n=11)	PIGF pg/mL (n=10)	sFlt-1/ PIGF (n=10)	sFlt-1 pg/mL (n=43)	PIGF pg/mL (n=38)	sFlt-1/ PIGF (n=38)	sFlt-1	PIGF	sFlt-1/ PIGF
26340,7 (5770,9)	70,1 (146,8)	374,2 (840,2)	24589,9 (8803,1)	92,8 (142,3)	286,0 (229,6)	8846,3 (15879,5)	59,1 (88,3)	155,8 (270,0)	<0,001*	0,197	0,022*
Comparação						sFlt-1 p	PIGF p	sFlt-1/PIGF p			
Gestantes PE precoce X Gestantes PE tardia						0,151	NS	0,273			
Gestantes PE precoce X Gestantes Normotensas						< 0,001*	NS	0,008*			
Gestantes PE tardia X Gestantes Normotensas						< 0,001*	NS	0,218			

Os dados não-paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil). NS: não significativo.

*p<0,05. A comparação dois a dois foi feita pelo teste Kruskal Wallis com pós teste de Bonferroni, p significativo para p<0,017 (correção de Bonferroni).

A curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC) (**figura 7**) com a razão sFIt-1/PIGF com todos os dados ($n=32$) dos sub-grupos de gestantes com PE precoce e gestantes com PE tardia foi construída calculando o *ratio* individual para cada gestante e posteriormente utilizado a mediana para classificar categoricamente em 0 ou 1. Após essa classificação os dados foram analisados no programa *R-project* para examinar o valor da área da curva ROC através do gráfico com o objetivo de verificar maiores estudos sobre a utilização do *ratio* sFIt-1/PIGF como marcador de casos de PE.

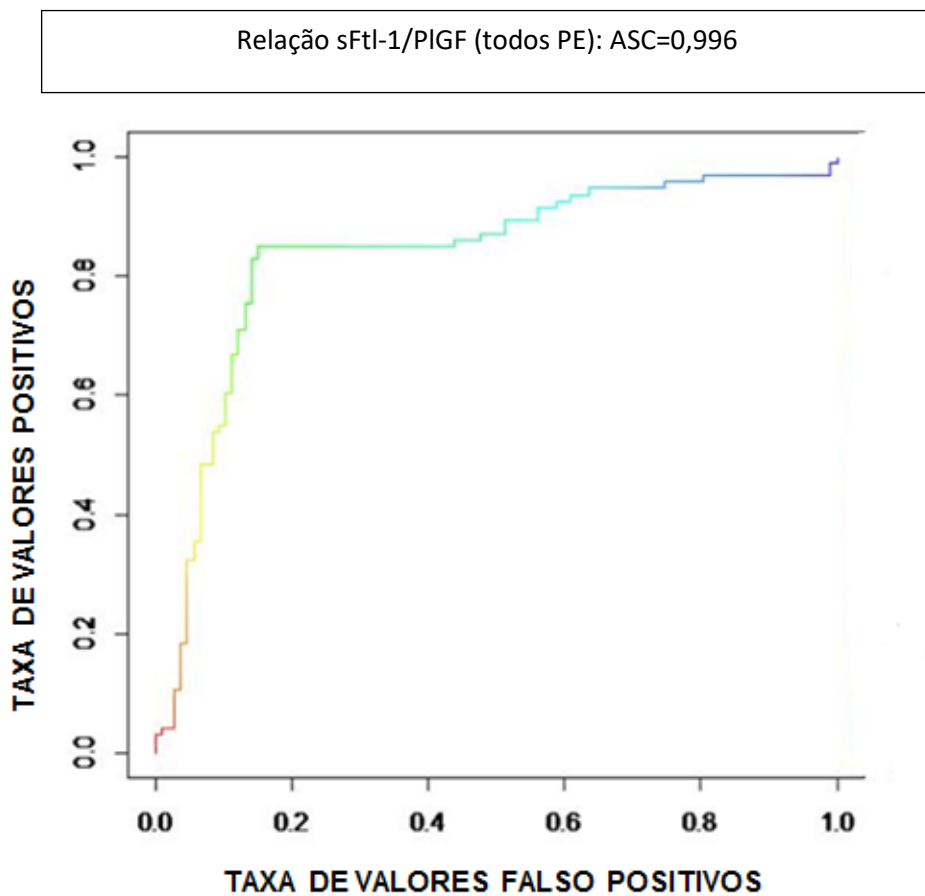


Figura 7 - Curva ROC da relação de sFIt-1/PIGF com os demais dados ($n=32$) dos sub-grupos de gestantes que desenvolveram PE precoce e gestantes que desenvolveram PE tardia.

A área sob a curva (ASC) encontrada foi 0,996 apresentando um intervalo de confiança de 0,984 – 1 e um valor de 101,28 de razão sFIt-1/PIGF para melhor marcar os casos de PE.

5.2 Estudo longitudinal

5.2.1 Características clínicas

As características clínicas dos grupos (gestantes que desenvolveram PE e gestantes que não desenvolveram), avaliados no estudo longitudinal, estão expostas na **tabela 4**.

Tabela 4 - Características clínicas das gestantes participantes do estudo longitudinal.

Parâmetros	Gestantes que desenvolveram PE (n=11)	Gestantes que não desenvolveram PE (n=17)	p
Idade (anos) ^a	27,1 ± 5,2	26,1 ± 8,1	0,239
Altura (m) ^b	1,65 ± 0,09	1,61 ± 0,07	0,168
Peso na inclusão do estudo (Kg) ^b	79,7 ± 23,8	62,5 ± 9,9	0,142
IMC (kg/m ²) ^b	30,9 ± 9,3	23,9 ± 2,4	0,094
PA sist. na inclusão do estudo (mmHg) ^b	116,2 ± 9,6	110 ± 10,8	0,270
PA diast. na inclusão do estudo (mmHg) ^b	75,8 ± 8,0	68,8 ± 9,0	0,138
PA sist. - 2ª aferição (mmHg) ^b	122,2 ± 17,6	114,9 ± 8,6	0,254
PA diast. - 2ª aferição (mmHg) ^b	79,0 ± 11,7	71,1 ± 7,7	0,072
PA sist. na internação para o parto (mmHg) ^b	152,0 ± 15,5	115,7 ± 9,4	0,001*
PA diast. na internação para o parto (mmHg) ^b	104,2 ± 10,8	75,4 ± 8,0	0,001*
Nº de gestações (mediana, limites)	2 (1-3)	1 (1-3)	-

Os dados não paramétricos são apresentados como média e ± desvio padrão. a: Teste Mann-Whitney b: Teste t de student; *p<0,05 estatisticamente significativo. PA: pressão arterial; sist: sistólica; diast: diastólica; IMC: Índice de massa corporal;

Não foram obtidas diferenças significativas entre as médias/medianas dos parâmetros idade, altura, peso e IMC comparando-se os dois grupos. As pressões sistólica ($p=0,001$) e diastólica ($p=0,001$) foram significativamente elevadas apenas no momento da internação até o parto nas gestantes que desenvolveram PE ($p=0,001$ para ambos).

5.2.2 Avaliação dos níveis plasmáticos de PIGF e sFlt-1 nas gestantes com PE grave e nas gestantes normotensas

No período de 12 a 19 e 20 a 29 os níveis de PIGF foram menores nas gestantes que desenvolveram PE em relação as que não desenvolveram ($p=0,023$ e $p=0,003$, respectivamente). A razão sFlt-1/PIGF nos três períodos, 12 a 19, 20 a 29 e 30 a 34 semanas, foi maior nas gestantes que desenvolveram PE em relação as que não desenvolveram ($p=0,014$, $p=0,036$ e $p=0,025$, respectivamente), como mostra a **tabela 5**. Os níveis de sFlt-1 foram maiores apenas no intervalo de 30 a 34 semanas nas gestantes que desenvolveram PE em comparação com as que não desenvolveram ($p=0,025$).

A comparação dos níveis de PIGF, sFlt-1 e da razão sFlt-1/PIGF, no período de 35 a 40 semanas entre os dois grupos, não foi realizada devido ao reduzido número de amostras, durante esse período, de gestantes que desenvolveram PE.

Tabela 5 - Níveis plasmáticos de PIGF, sFlt-1 e razão sFlt-1/PIGF em gestantes que desenvolveram e não desenvolveram PE em cada período gestacional.

Valores de p obtidos nos períodos gestacionais – Estudo longitudinal									
PG	GESTANTES QUE DESENVOLVERAM PE (n=11)			GESTANTES QUE NÃO DESENVOLVERAM PE (n=17)			p		
	sFlt-1 pg/mL	PIGF pg/mL	sFlt-1/PIGF	sFlt-1 pg/mL	PIGF pg/mL	sFlt-1/PIGF	sFlt-1	PIGF	sFlt-1/PIGF
12 – 19 s	1085,9 [1281,01] (n=06)	26,7 [38,7] (n=06)	39,1 [83,5] (n=06)	788,9 [323,4] (n=13)	98,8 [89,1] (n=13)	7,4 [11,7] (n=13)	0,335	0,023*	0,014*
20 – 29 s	878,4 [1666,90] (n=11)	122,6 [105,8] (n=11)	6,7 [16,5] (n=11)	1039,7 [465,1] (n=15)	324,9 [307,7] (n=15)	2,9 [2,7] (n=15)	0,659	0,003*	0,036*
30 – 34 s	2256,8 [1251,5] (n=04)	294,2 [473,2] (n=04)	5,9 [25,9] (n=04)	1299,3 [703,3] (n=17)	667,5 [622,2] (n=17)	1,6 [2,2] (n=17)	0,025*	0,089	0,025*
≥ 35s	3353,2 (n=01)	168,0 (n=01)	19,9 (n=01)	2341,9 [1387,0] (n=10)	439,5 [616,8] (n=10)	4,4 [9,6] (n=10)	-	-	-

Dados não paramétricos, realizados pelo teste de Mann Whitney, sendo *p significativo < 0,05. Resultados dos “valores de p obtidos nos períodos gestacionais” apresentados como mediana e intervalo interquartil [IQ]; PG: período gestacional; PE: pré-eclâmpsia; s: semanas; (-): não há dados suficientes para análise.

A **figura 8** representa a análise bivariada do PIGF, entre as gestantes que desenvolveram PE e as gestantes que não desenvolveram. Os níveis plasmáticos de PIGF aumentaram durante a gestação em ambos os grupos de mulheres, com pico de 30-34 semanas e um pouco decrescente depois, mas foram maiores nas gestantes que desenvolveram PE do que nas gestantes que não desenvolveram a doença durante a gestação

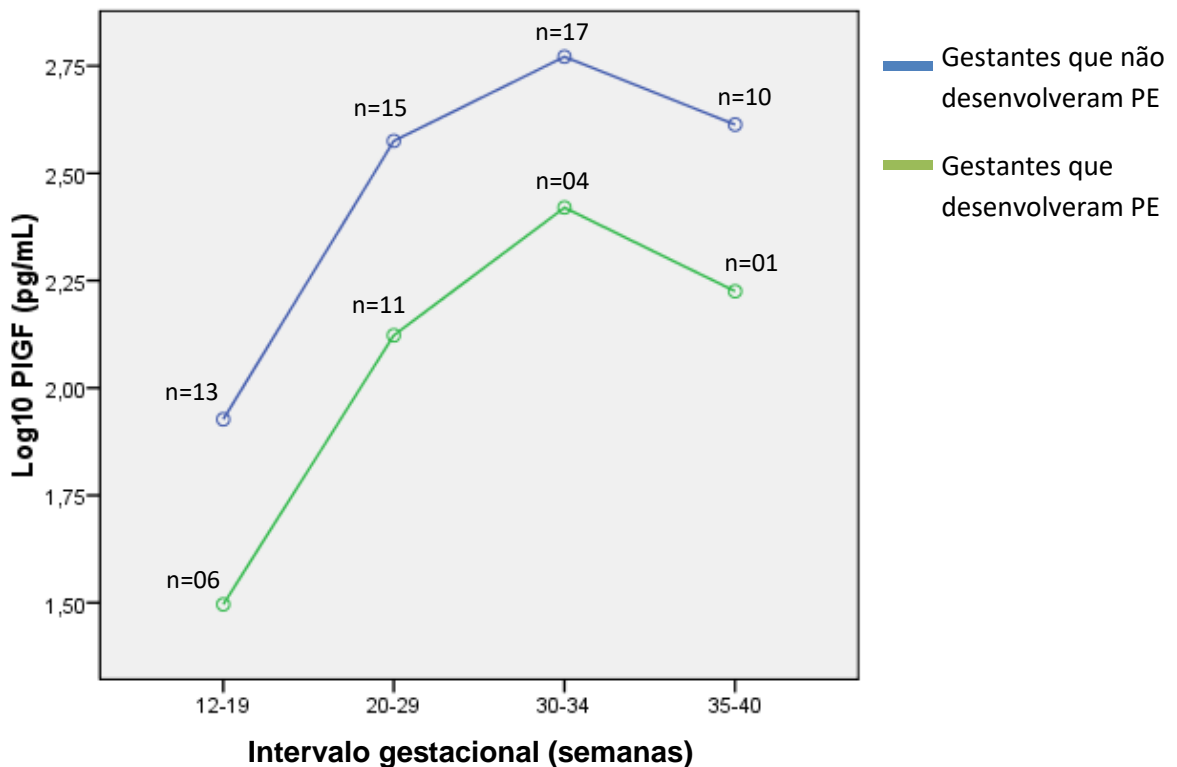


Figura 8 – Log10 dos níveis plasmáticos de PIGF em gestantes que desenvolveram PE e nas que não desenvolveram PE durante os quatro períodos gestacionais avaliados.

Na **figura 9**, é possível observar a análise bivariada GLM da concentração plasmática de sFlt-1 nas gestantes que desenvolveram e não desenvolveram PE durante os quatro períodos gestacionais avaliados. Houve um aumento gradual dos níveis plasmáticos de sFlt-1 em mulheres grávidas normotensas, com um pico às 35-40 semanas. A concentração de sFlt-1 diminuiu ligeiramente do intervalo 12-19 para o intervalo de 20-29 em mulheres grávidas que desenvolveram PE. Aumentando após esse intervalo até o final da gravidez. Gestantes que desenvolveram PE apresentaram níveis mais elevados de sFlt-1 do que gestantes que não desenvolveram a doença em todos os períodos gestacionais avaliados, exceto no intervalo de 20-29 semanas onde a queda foi observada.

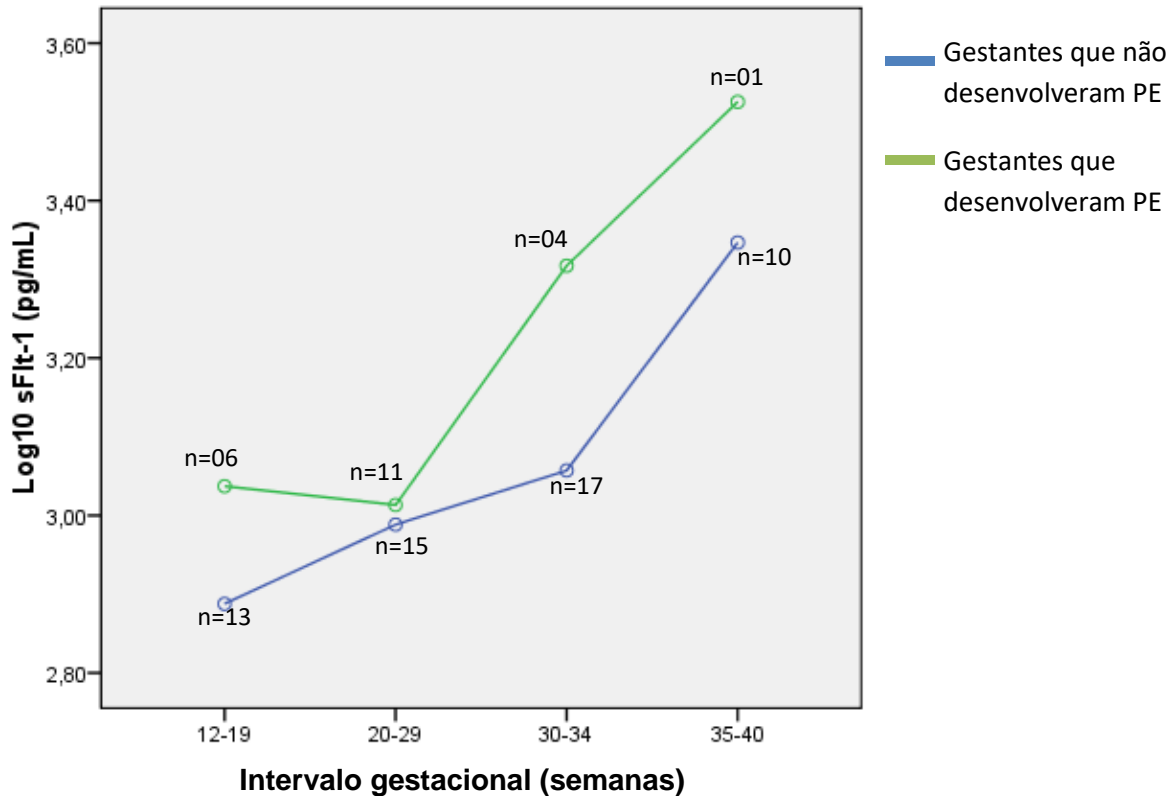


Figura 9 – Log10 dos níveis plasmáticos de sFlt-1 em gestantes que desenvolveram PE e nas que não desenvolveram PE durante os quatro períodos gestacionais avaliados.

A **figura 10** representa a análise bivariada GLM da razão sFlt-1/PIGF nas gestantes que desenvolveram e nas que não desenvolveram PE durante os quatro períodos gestacionais avaliados. Em ambos os grupos de mulheres, a razão sFlt-1/PIGF diminuiu do intervalo gestacional 12-19 semanas para o 20-29 semanas. No intervalo de 30-34 semanas a razão permaneceu estável em mulheres que desenvolveram PE e diminuiu nesse período gestacional em gestantes normotensas. No intervalo gestacional 35-40 semanas a razão sFlt-1/PIGF aumentou em ambos os grupos. Em todos os períodos gestacionais, a relação sFlt-1/PIGF foi maior em gestantes que desenvolveram PE do que em gestantes que não desenvolveram a doença

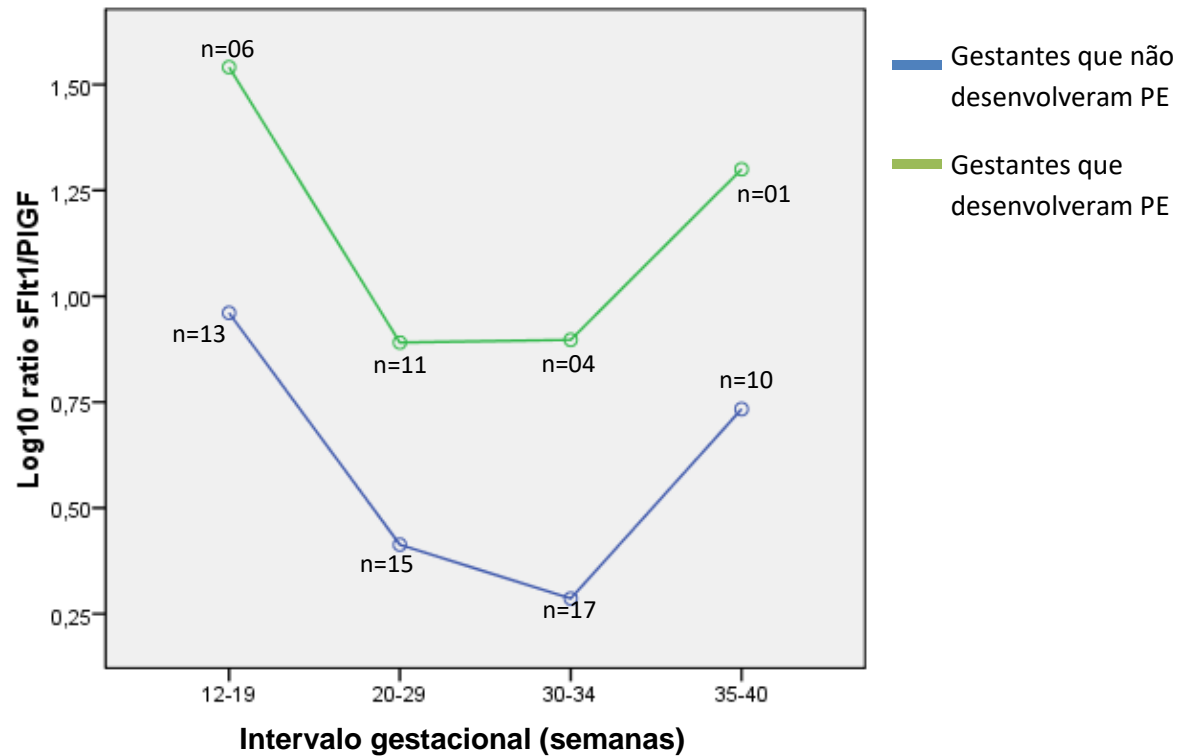


Figura 10 - Log₁₀ da razão sFlt-1/PIGF em gestantes que desenvolveram PE e nas que não desenvolveram PE durante os quatro períodos gestacionais avaliados.

A comparação das concentrações plasmáticas de PIGF, sFlt-1, razão sFlt-1/PIGF em cada grupo de gestantes foi também realizada considerando os períodos gestacionais dois a dois, como mostra a **tabela 6**.

Tabela 6 – Concentração (pg/mL) de PIGF, sFlt-1 e razão sFlt-1/PIGF em gestantes que desenvolveram e não desenvolveram PE comparando-se os períodos gestacionais dois a dois.

Valores de p obtidos na comparação entre períodos gestacionais						
PG	GESTANTES QUE DESENVOLVERAM PE (n=11)			GESTANTES QUE NÃO DESENVOLVERAM PE (n=17)		
	sFlt-1 p	PIGF p	sFlt-1/PIGF p	sFlt-1 p	PIGF p	sFlt-1/PIGF p
12 – 19 s x 20 – 29 s	0,763	0,007*	0,056	0,076	<0,001*	0,001*
12 – 19 s x 30 – 34 s	0,136	0,019*	0,055	0,010*	<0,001*	<0,001*
12 – 19 s x ≥ 35 s	-	-	-	<0,001*	0,010*	0,121
20 – 29 s x 30 – 34 s	0,151	0,192	0,896	0,282	0,043*	0,249
20 – 29 s x ≥ 35 s	-	-	-	<0,001*	0,782	0,096
30 – 34 s x ≥ 35 s	-	-	-	<0,001*	0,183	0,004*

Dados não paramétricos, realizados pelo teste de Mann Whitney, sendo *p significativo < 0,05. PG: período gestacional; PE: pré-eclâmpsia; s: semanas; (-): não há dados suficientes para análise.

As concentrações plasmáticas de PIGF foram menores, nas gestantes que desenvolveram PE, ao comparar 12 a 19 semanas x 20 a 29 semanas e 12 a 19 semanas x 30 a 34 semanas (p=0,007 e p=0,019, respectivamente). A comparação dos níveis no período de 35 a 40 semanas não foi realizada pela insuficiência da quantidade dos dados. A comparação dos níveis de sFlt-1 e da razão sFlt-1/PIGF não mostrou diferenças significativas nesse grupo de gestantes. Porém, revelou que, nas gestantes que desenvolveram PE, ao longo das gestação foi diminuindo, porém ao se

comparar com as gestantes que não desenvolveram PE houve uma tendência na diminuição da razão sFlt-1/PIGF na comparação de 12 a 19 x 20 a 29 semanas e entre 12 a 19 x 30 a 34 semanas ($p=0,056$ e $p=0,055$, respectivamente).

Para as gestantes que não desenvolveram PE, a comparação dos níveis de PIGF, sFlt-1 e da razão sFlt-1/PIGF revelou que os níveis de PIGF foram menores nas comparações entre as semanas: 12 a 19 x 20 a 29 semanas ($p<0,001$), 12 a 19 x 30 a 34 semanas ($p<0,001$), 12 a 19 x 35 a 40 semanas ($p=0,01$) e 20 a 29 x 30 a 34 semanas ($p=0,043$). As comparações entre os períodos finais da gestação não mostraram diferenças significativas.

Quanto aos níveis de sFlt-1 nas gestantes que não desenvolveram PE, foram obtidos níveis aumentados de sFlt-1 na comparação das semanas: 12 a 19 x 30 a 34 semanas ($p=0,01$), 12 a 19 x 35 a 40 semanas ($p<0,001$), 20 a 29 x 35 a 40 semanas ($p<0,001$) e 30 a 34 x 35 a 40 semanas ($p<0,001$).

Nas gestantes, que não desenvolveram PE, a razão sFlt-1/PIGF foi menor nas comparações das semanas: 12 a 19 x 20 a 29 semanas, 12 a 19 x 30 a 34 semanas, 30 a 34 x 35 a 40 semanas ($p=0,001$; $p<0,001$; $p=0,004$, respectivamente).

6 DISCUSSÃO

6.1 Estudo transversal

O estudo transversal foi realizado com 82 gestantes, avaliadas no terceiro trimestre da gestação, sendo 39 classificadas como gestantes com PE grave e 43 como normotensas.

A avaliação das características clínicas das gestantes revelou resultados compatíveis com o esperado. Ao comparar a P.A diastólica e a P.A. sistólica nos dois grupos, ambas se mostraram mais elevadas nas gestantes com PE em relação às gestantes normotensas. O aumento da pressão na PE pode ser explicado por diversas alterações como: o aumento fisiológico do volume sanguíneo durante a gestação (que ocorreria sem redução na resistência vascular uterina e sistêmica), o comprometimento da função renal (perda da integridade das células endoteliais glomerulares) (BOELDT; BIRD, 2017) e a diminuição nas gestantes com PE, dos níveis de NO (um vasodilatador potente) (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

O ganho de peso no grupo de mulheres com PE não apresentou diferença significativa em relação às gestantes normotensas. O aumento súbito de peso pode surgir pela perda de albumina na urina (responsável pela manutenção da pressão oncótica), acometimento dos capilares renais (consequente à inflamação endotelial), estresse oxidativo, que resultam em lesão do endotélio ocasionando extravasamento do plasma para o espaço intersticial. Esse extravasamento resulta em edema, o qual justificaria um maior ganho de peso ponderal nas gestantes pré-eclâmpticas. O edema já fez parte da tríade de diagnóstico para a PE, junto ao aumento da pressão arterial e da proteinúria. No entanto, como o edema também ocorre em muitas condições clínicas e na gestação normal, esse não constitui um achado fidedigno da PE. Dessa forma, o Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas, a Sociedade Australiana para o Estudo da Hipertensão na Gravidez e a Sociedade Canadense de Hipertensão, dentre outros, excluíram o edema do critério diagnóstico da doença. De fato, no presente estudo, não houve diferença significativa no ganho de peso comparando-se as gestantes com PE e normotensas (BOELDT; BIRD, 2017; CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; ROCCELLA, 2000).

Em relação à proteinúria, as gestantes do grupo que apresentaram PE grave mostraram valores aumentados enquanto que as normotensas não haviam relatos laboratoriais de proteinúria. A proteinúria surge devido à lesão renal que, com

frequência, as gestantes com PE apresentam. Um dos mecanismos responsáveis pela proteinúria é o desequilíbrio entre os fatores angiogênicos e antiangiogênicos. Dessa forma, o VEGFR1 bloqueia o efeito do VEGF livre que resulta no comprometimento da função do endotélio fenestrado, resultando em proteinúria (CHAIWORAPONGSA; CHAEMSAITHONG; YEO; *et al.*, 2014; LEVINE RJ, MAYNARD SE *et al.*, 2004). Em 2014, a ISSHP definiu que a proteinúria não é mais um critério de diagnóstico obrigatório para PE, embora sua presença contribua para a confirmação desse diagnóstico (MOL *et al.*, 2015).

O PIGF consiste em uma glicoproteína dimérica secretora que está envolvida nos processos de angiogênese e vasculogênese. Durante o processo de placentação, esse fator é secretado pela placenta a fim de auxiliar a invasão da artéria espiralada, pelos trofoblastos, e na sua conseqüente remodelação, uma vez que atua promovendo a proliferação e conservação das células endoteliais e estimula a permeabilidade vascular (LECARPENTIER; TSATSARIS, 2016).

O sFlt-1, em uma gestação normal, é secretado com o objetivo de competir pelo sítio de ligação com o VEGF e com o PIGF, controlar a regulação excessiva de VEGF minimizando seus efeitos tóxicos (FAN *et al.*, 2014; LECARPENTIER; TSATSARIS, 2016). Em gestações com PE, a hipóxia, ocasionada pela remodelação defeituosa da placenta, estimula a superprodução de sFlt-1 pois, a expressão do gene Flt-1 é altamente regulada pelos níveis de oxigênio. Desta maneira, há inibição dos efeitos de VEGF e PIGF no endotélio materno. Sendo assim, o aumento de níveis circulantes de sFlt-1 e a diminuição de níveis circulantes de PIGF seria esperado em gestantes com PE.

A avaliação dos níveis de PIGF e sFlt-1, nas gestantes com PE grave e nas normotensas (tabela 2) revelou que as concentrações plasmáticas de sFlt-1 circulantes foram significativamente maiores nas gestantes pré-eclâmpticas ($p < 0,001$) e enquanto que as concentrações de PIGF não foram significativas em comparação às normotensas. Em gestantes com PE precoce, o PIGF apresentou concentrações plasmáticas menores do que em gestantes com PE tardia. Talvez porque estas, ainda não se encontravam no momento de maior declínio do PIGF.

Em concordância, outros pesquisadores relataram valores elevados de sFlt-1 na PE. Hoeller *et al.* (2017) avaliaram 12 gestantes, sendo seis com PE e seis normotensas, e obtiveram valores aumentados de sFlt-1 plasmático nas gestantes com PE. Avaliaram, também os níveis de sFlt-1 na placenta e esses foram inferiores

aos valores plasmáticos. Esses pesquisadores relataram, ainda, que os níveis de sFlt-1 estavam elevados e os de PIGF diminuídos, no início da PE precoce e na CIUR precoce (HOELLER *et al.*, 2017).

Birdir *et al.* avaliaram 730 gestantes com idades gestacionais de 32 a 37 semanas, das quais somente 22 desenvolveram CIUR e 32 PE. Os níveis plasmáticos de PIGF foram menores e de sFlt-1 foram maiores nas gestantes com PE e CIUR, em comparação as gestantes do grupo controle. Nesse estudo, os níveis de PIGF, sFlt-1 e a razão sFlt-1/PIGF mostraram-se bons preditores para a PE de início tardio e CIUR (BIRDIR *et al.*, 2018).

Em 2016, Tang *et al.*, avaliaram os níveis plasmáticos e urinários de PIGF e sFlt-1 em 80 gestantes, com idade gestacional de 21 a 31 semanas, das quais 44 tiveram PE leve e 36 PE grave. Como controle, foram incluídas 40 gestantes normotensas, com idade gestacional de 20 a 32 semanas. Os níveis plasmáticos e urinários de PIGF foram bem menores em gestantes com PE leve comparando-se com gestantes com PE grave e concomitantemente menores que dos controles. Esses pesquisadores destacaram a importância do PIGF para o diagnóstico da PE, bem como para avaliar a sua gravidade (TANG *et al.*, 2016).

Sabe-se que o trofoblasto produz, fisiologicamente, o sFlt-1 e essa produção aumenta com o avanço da idade gestacional. Admite-se que a produção de sFlt-1, em regime de hipóxia como o que ocorre na PE, tem regulação positiva placentária em gestantes com PE, ou seja, à medida que a gravidez avança e a placenta aumenta de tamanho, elevam-se os níveis de sFlt-1 (JIM; KARUMANCHI, 2017; KARUMANCHI; EPSTEIN, 2007).

Admite-se também que a regulação dos níveis de sFlt-1 está relacionada à redução dos níveis de VEGF e PIGF livres circulantes (JIM; KARUMANCHI, 2017). Diversos estudos revelaram diminuição significativa de PIGF livre na PE juntamente com o aumento de sFlt-1 relacionados a gravidade da doença e essas alterações são vistas antes do surgimento dos sintomas clínicos (ANDERSEN *et al.*, 2016; BIRDIR *et al.*, 2018; TANG *et al.*, 2016).

Possíveis explicações para a diminuição de PIGF incluem a redução da biossíntese do PIGF, redução da disponibilidade de oxigênio ou o excesso de sFlt-1 circulante (KAWASHIMA *et al.*, 2015). Em 2015, Kawashima *et al.* avaliou tecidos de gestantes que passaram por procedimentos cirúrgicos durante a 7ª ou 8ª semana de gestação. Esses pesquisadores concluíram que a expressão de PIGF pelos

trofoblastos é estimulada por concentrações elevadas de oxigênio e reduzida quando esta disponibilidade está comprometida (KAWASHIMA *et al.*, 2015). Além disso, alguns pesquisadores sugerem que a diminuição dos níveis de PIGF circulantes possa ter iniciado no primeiro trimestre de gestação (KAWASHIMA *et al.*, 2015).

Hoeller *et al.* avaliaram os níveis de PIGF na placenta, em gestantes com idade gestacional inferior a 34 semanas, e revelaram que a diminuição de PIGF circulante pode ocorrer devido ao aumento de sFlt-1, pois a produção de PIGF não se mostrou diminuída a nível placentário, mesmo com a presença da disfunção placentária. Enquanto que o sFlt-1 tem sua produção aumentada na placenta em PE de início precoce (HOELLER *et al.*, 2017). Essa hipótese poderia justificar a não obtenção de redução significativa de PIGF nas gestantes com PE no nosso estudo uma vez que as gestantes já estavam no terceiro trimestre de gestação no momento da coleta e os valores de sFlt-1 já se encontravam aumentados.

Zeisler *et al.*, em um estudo envolvendo 500 gestantes no terceiro semestre (de 24 semanas a 36 semanas e 6 dias) determinaram a razão sFlt-1/PIGF em três grupos de gestantes: com PE, síndrome HELLP e normotensas. A razão sFlt-1/PIGF mostrou-se eficaz para prever a ausência de PE em gestantes com suspeita clínica de PE (ZEISLER *et al.*, 2016).

Ehrlich *et al.* avaliaram a razão sFlt-1/PIGF placentária e plasmática de gestantes com PE tardia e CIUR em comparação às gestantes normotensas (IG>27 semanas e 6 dias). Em concordância com o presente estudo, os níveis de sFlt-1 foram elevados na PE em relação às normotensas e ao grupo que teve CIUR. Houve uma tendência de redução dos níveis de PIGF na PE e na CIUR ao comparar com as gestantes normotensas. Não houve diferença entre os níveis de PIGF no tecido placentário e no plasma (EHRlich *et al.*, 2017).

Andersen *et al.*, 2016, avaliaram os níveis de PIGF, sFlt-1 e a razão sFlt-1/PIGF no plasma de 1016 gestantes (IG=8-14 semanas), 1595 gestantes (IG=20-34 semanas), e em 954 gestantes que tiveram a coleta realizada nos dois momentos. Os resultados encontrados demonstraram que os valores preditivos, de ambos os marcadores, são mais eficazes nos casos de PE grave com início precoce, ou seja, quando os sintomas surgiram antes da 34ª semana. A razão sFlt-1/PIGF mostrou-se eficiente para predizer os subtipos de PE (ANDERSEN *et al.*, 2016).

No presente estudo, visando avaliar a fidedignidade dos níveis de PIGF e sFlt-1 para distinguir as formas clínicas da PE (precoce e tardia), a comparação desses

níveis foi feita distribuindo-se as gestantes com PE em função da forma clínica da doença. Das 28 gestantes com PE avaliadas, 11 apresentavam a forma precoce e 28 a tardia. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos PE precoce e PE tardia quando comparadas as concentrações de sFlt-1 e PIGF. Estes dados mostram que estes marcadores, determinados no 3º trimestre de gestação, não foram eficazes para discriminar as formas clínicas da PE. Para esclarecer o potencial destes marcadores para prever a ocorrência de PE, a coleta seriada de amostras da mesma gestante (longitudinal) seria mais promissora para estabelecer os pontos de corte para distinção das formas precoce e tardia da PE.

Com relação à gravidade da PE, Tang *et al.*, 2016, demonstraram que os níveis plasmáticos e urinários de sFlt-1 e PIGF podem ser úteis como indicativos da gravidade da doença. Quanto mais grave o estado clínico, mais elevados os níveis de sFlt-1 e menores os de PIGF (TANG *et al.*, 2016).

Sabendo que a curva ROC desempenha um papel importante para determinar o *cut off* adequado para indicar a presença ou não de uma doença, essa foi feita para os dois marcadores avaliados neste estudo. Essa curva permite estabelecer um ponto de corte em que os valores de especificidade e sensibilidade serão mais precisos. Entende-se por sensibilidade a possibilidade de o teste ter resultado positivo em indivíduo que tenha a doença. E especificidade como sendo a possibilidade de o teste resultar em negativo quando o paciente não possui a doença. Em cada ponto de corte, são determinados os valores de especificidade e de sensibilidade que ao se ligarem formam a curva ROC. Quanto maior a capacidade para diferenciar os indivíduos doentes dos não doentes, mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo, e o melhor teste é aquele em que o valor da área sob a curva (ASC) se aproxima de 1 (LOPES *et al.*, 2014).

A capacidade preditiva da razão sFlt-1/PIGF para o diagnóstico de PE tem sido investigada por vários pesquisadores nos últimos anos, uma vez que se mostra mais eficaz para prever o aparecimento de PE do que os níveis de PIGF e sFlt-1 isoladamente (BIRDIR *et al.*, 2018). Visando definir um valor que auxiliasse na predição da PE, foi realizado a curva ROC em que o valor de corte para a razão sFlt-1/PIGF encontrado foi 101,28. A ASC teve seu valor bem próximo a 1, mais precisamente (ASC=0,996) indicando que este é um bom teste e que seu resultado de corte pode ser considerado. No entanto, pelo número limitado de gestantes

incluídas no presente estudo, esse pode ser considerado apenas como um valor preliminar. O valor obtido, 101,28, foi superior ao encontrado em outros estudos, o que poderia ser explicado pela idade gestacional, pelo grupo de gestantes avaliados ser da forma grave da doença e pelas características étnicas das gestantes. Ohkuchi *et al.* obtiveram o valor de *cut off* de 45 e foi mais específico para prever PE de início precoce em um estudo envolvendo gestantes nos períodos de 19 a 25, 27 a 31 e 34 a 38 semanas de gestação (OHKUCHI *et al.*, 2010). Em 2016, o Zeisler *et al.*, estabeleceu que 38 seria um valor adequado para prever a PE em gestantes clinicamente suspeitas, pois valores abaixo deste corte indicariam ausência de PE (ZEISLER *et al.*, 2016).

Em 2017, Dröge *et al.*, o ponto de corte encontrado foi de 103, com uma sensibilidade de 87,88% e uma especificidade de 91,67% para desfechos de casos de PE. As gestantes avaliadas tinham idade gestacional acima de 20 semanas (DRÖGE *et al.*, 2017).

Chuah *et al.*, 2018, mostraram que o ponto de corte estabelecido foi 32, independentemente da idade gestacional. Este estudo foi realizado com uma população de gestantes asiáticas e envolveu apenas 82 gestantes, das quais 48 desenvolveram PE. A razão sFlt-1/PIGF foi mais precisa para determinar PE de início precoce em comparação a PE de início tardio, pois, para a de início precoce os valores de especificidade e sensibilidade foram bem maiores. Este ponto de corte, de 32, mantém a especificidade das gestantes com início tardio, mas diminui a sua sensibilidade (CHUAH *et al.*, 2018).

Em um estudo realizado recentemente em dois hospitais brasileiros, Figueira *et al.* 2018, avaliaram economicamente a implementação da razão sFlt-1/PIGF para prever a ocorrência de PE em gestantes com 24 a 36 semanas + 6 dias. Essa razão mostrou-se eficaz, contribuindo para as tomadas de decisões clínicas, gerando economia significativa ao evitar internações desnecessárias, além de possibilitar a alocação adequada dos recursos financeiros escassos. Para a tomada de decisão, as gestantes foram classificadas em três faixas de acordo com o valor de razão sFlt-1/PIGF; valores <38, se referiam a mulheres com baixo risco de desenvolvimento de PE, e sem necessidade de internação. Nessas gestantes a razão foi determinada novamente, duas semanas após, para confirmar o resultado. Valores entre 38 e 85 serviram de alerta para o desenvolvimento de PE e valores >85 demonstraram alto risco para o desenvolvimento de PE (FIGUEIRA *et al.*, 2018).

Os pontos de corte obtidos no presente estudo foram diferentes daqueles encontrados frequentemente na literatura. É possível inferir que diferenças étnicas, considerando especialmente a grande miscigenação da população brasileira, possam justificar esse fato (CHUAH *et al.*, 2018). Deve-se levar também em consideração o tamanho da amostra relativamente pequeno que foi utilizado em nosso estudo, ao comparar com os estudos das outras populações encontradas na literatura. Além disso, valores de corte próximos de 38 determinam a suspeita de PE, enquanto que valores acima de 85 considera-se que já há o diagnóstico da doença (STEPAN *et al.*, 2015). Desta maneira, o valor de corte para sFlt-1/PIGF de 101,28 corrobora com o encontrado por Figueira *et al.*, ou seja, valores acima de 85 indicaram alto risco de ocorrência de PE (FIGUEIRA *et al.*, 2018).

Em resumo, os resultados obtidos no nosso estudo transversal, demonstraram que os níveis de sFlt-1 e a razão sFlt-1/PIGF, no terceiro semestre de gestação, são eficazes para o diagnóstico de PE grave. No entanto, não foram capazes de diferenciar as formas precoce e tardia da doença. O valor preliminar de 101,28 para de *cut-off* da razão sFlt-1/PIGF, determinado pela curva ROC teve excelente acurácia e correspondeu ao que é encontrado na literatura, mostrando-se bom marcador de diagnóstico para a PE.

6.2 Estudo longitudinal

O estudo longitudinal incluiu 28 gestantes que apresentavam fatores de risco para PE, cujas amostras de sangue foram coletadas em quatro períodos gestacionais (12 a 19 semanas, 20 a 29 semanas, 30 a 34 semanas e maior que 35 semanas), o que possibilitou avaliar a variação dos níveis de sFlt-1, PIGF e a razão sFlt-1/PIGF ao longo da gestação nas 11 gestantes que desenvolveram PE e nas 17, que não desenvolveram a doença.

A definição dos períodos gestacionais visou englobar os momentos cruciais da gestação, desde a invasão trofoblástica (a partir da 8^a semana), passando pela fase de início dos sintomas clínicos da PE (a partir da 20^a semana), a 34^a semana de gestação (que distingue as formas precoce e tardia da PE) até a fase final da gestação (≥ 35 semanas). Além disso, os períodos gestacionais avaliados envolveram os três trimestres da gestação. Dessas mulheres, 11 desenvolveram PE e 17 mantiveram-se normotensas (figura 6). Dentre as gestantes que desenvolveram PE, quatro apresentaram PE grave.

A P.A., tanto sistólica, quanto diastólica, apresentou aumento significativo no momento da internação, nas gestantes que desenvolveram PE em relação às que não desenvolveram a doença, como seria esperado. A idade, peso e IMC não apresentaram diferenças entre os dois grupos (tabela 1).

As figuras 8,9 e 10 ilustram a dinâmica dos níveis plasmáticos de PIGF e sFlt-1 e da razão sFlt-1/PIGF ao longo da gestação em gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE. Os níveis de PIGF foram aumentando ao longo da gestação até 30-34 semanas em ambos os grupos. No entanto, esse aumento nas gestantes que desenvolveram PE foi bem menos expressivo. No final da gestação (≥ 35 semanas), houve uma tendência de diminuição dos níveis de PIGF nas gestantes que não desenvolveram PE. Como havia apenas uma amostra de gestante que desenvolveu PE, não foi possível obter conclusão acerca dos níveis de PIGF ao final da gestação nessa doença.

Em relação ao sFlt-1, nas gestantes que não desenvolveram PE, houve uma tendência de aumento até 30-34 semanas e um aumento expressivo de 30-34 até ≥ 35 semanas. Nas gestantes que desenvolveram PE, houve uma tendência de diminuição nos níveis de sFlt-1 até 20-29 semanas. A partir desse período, até 30-34 semanas,

os níveis sFlt-1 aumentaram expressivamente em comparação com as gestantes que não desenvolveram PE.

A análise das curvas obtidas para os níveis plasmáticos de PIGF e sFlt-1 e a razão sFlt-1/PIGF nos dois grupos de gestantes, que desenvolveram e não desenvolveram PE, deixa clara a superioridade da razão para auxiliar na predição da ocorrência de PE, em relação aos valores isolados de PIGF e sFlt-1. A *performance* da curva da razão é especialmente distinta no período inicial da gestação e os valores obtidos são mais elevados nos períodos 12-19, 20-19 e 30-34 semanas nas gestantes que desenvolveram PE comparando-se às que não desenvolveram a doença. A comparação dessa razão ao final da gestação, ≥ 35 semanas, não foi possível obter, uma vez que havia somente uma amostra de gestante que desenvolveu PE nesse período gestacional. Tem sido admitido que, em condições fisiológicas, níveis elevados de PIGF, no início da gestação, são essenciais para o processo de placentação (KHALIL *et al.*, 2016; THADHANI *et al.*, 2004). De fato, no presente estudo, os níveis de PIGF foram estatisticamente elevados ($p=0,003$) até a 29ª semana de gestação nas gestantes que não desenvolveram PE comparando-se às que desenvolveram a doença (tabela 5).

Cumprir destacar que poucos são os estudos encontrados na literatura em que foram determinados os níveis de PIGF e sFlt-1 e a razão sFlt-1/PIGF, ao longo da gestação, em um mesmo grupo de gestantes. Ohkuchi *et al.*, 2010, avaliaram os níveis plasmáticos de sFlt-1 e PIGF, pelo método de eletroquimioluminescência (Elecys-Roche) em 144 gestantes, nos períodos de 19 a 25, 27 a 31 e 34 a 38 semanas e em 34 gestantes com PE, que tiveram o sangue coletado logo após o diagnóstico da doença. Esses pesquisadores tinham por objetivo estabelecer um intervalo de referência para os níveis plasmáticos de sFlt-1 e PIGF, e a relação sFlt-1 / PIGF na segunda metade da gravidez e avaliar a sua sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de PE. Concluíram que a razão sFlt-1/PIGF, utilizando um valor de corte de 45, pode auxiliar no diagnóstico de PE, especialmente para a forma precoce da doença (OHKUCHI *et al.*, 2010).

Paradoxalmente, McElrath *et al.*, 2012, avaliaram os níveis de sFlt-1 e PIGF em 139 gestantes com PE nas semanas 10, 17, 25 e 35. Esses pesquisadores demonstraram que nas gestantes que mais tarde apresentaram PE, a mediana de PIGF foi menor a partir do segundo trimestre, mas a sFlt-1 não foi maior até o terceiro

trimestre. Concluíram que os níveis de PIGF e sFlt-1 não são úteis para prever ou descartar a ocorrência de PE (MCEL RATH *et al.*, 2012).

Herraiz *et al.* avaliaram 37 gestantes com CIUR e 38 com CIUR+PE e determinaram a relação sFlt-1/PIGF semanalmente até 48 horas antes do parto. Concluíram que as determinações repetidas dessa razão têm valor limitado, sendo útil apenas para prever a necessidade de realizar o parto no grupo CIUR+PE quando o valor dessa razão for superior a 655 (HERRAIZ *et al.*, 2017).

Tem sido proposto que o PIGF é mais eficaz na predição da PE no primeiro trimestre, quando associado à pressão arterial média, proteína plasmática A (PAPP-A) e doppler das artérias uterinas, incluindo em casos de mulheres nulíparas (BOUTIN *et al.*, 2018; KHALIL *et al.*, 2016), enquanto o sFlt-1 é considerado mais eficaz a partir do segundo trimestre (KHALIL *et al.*, 2016). Em concordância, no presente estudo, os níveis de sFlt-1 (tabela 5; figura1) elevaram visivelmente nas gestantes que desenvolveram PE em comparação às que não desenvolveram a partir de 29 semanas até 30-34 semanas (lembrando que o segundo trimestre inicia-se na 26-27 semanas) ($p=0,025$).

Sabe-se que a PE é caracterizada pelo comprometimento fisiopatológico nas artérias espiraladas do útero durante a invasão trofoblástica. Dessa forma, é possível inferir que a hipóxia causada por esse processo tenha suprimido o PIGF e regulado de forma positiva o sFlt-1 nas células trofoblásticas levando ao seu aumento durante a gestação. Além disso, o sFlt-1 pode se ligar ao PIGF, impedindo que aumente a atividade do VEGF e a formação de novos vasos sanguíneos (KHALIL *et al.*, 2016).

Em concordância com nossos dados, Levine *et al.*, 2004, demonstraram que durante a gestação normal, o sFlt-1 permanece estável e aumenta ao final, enquanto o PIGF tem seus níveis aumentados no início e diminui próximo ao parto (LEVINE RJ, MAYNARD SE *et al.*, 2004).

Palmer *et al.* avaliaram os níveis plasmáticos de sFlt-1 total e da fração e15a (que corresponde a principal isoforma liberada pela placenta) em 87 gestantes, das quais 11 desenvolveram PE e 20 tiveram CIUR. As amostras foram coletadas no primeiro trimestre (11 a 14 semanas), no segundo trimestre (22 a 24 semanas) e no terceiro trimestre (32 a 36 semanas) de gestação. Estudos anteriores realizados pelo mesmo grupo, mostraram que a fração e15a do sFlt-1 apresentou aumentos significativos nas gestantes com PE. Nas gestantes que tiveram CIUR, o sFlt-1 foi capaz de prever essa condição, com duas semanas de antecedência, devido ao

aumento dos seus níveis. Em gestantes normotensas, os níveis sFlt-1 aumentaram como o que ocorre fisiologicamente. Entretanto, no terceiro trimestre, os níveis totais de sFlt-1 tiveram um aumento maior em gestantes com PE, quando comparados às normotensas, de forma semelhante ao obtido no presente estudo (PALMER, K. R. *et al.*, 2016)

No presente estudo, a razão sFlt-1/PIGF, revelou valores maiores nas gestantes que desenvolveram PE em comparação com as que não desenvolveram a doença, nos três primeiros períodos avaliados (tabela 5; figura 10). Essa razão não foi determinada no período superior a 35 semanas em função do número pequeno de amostras de gestantes que desenvolveram PE.

Em estudo recente, Figueira *et al.* (2018) demonstraram que a razão sFlt-1/PIGF resultou em economia de custos em um hospital brasileiro, uma vez que possibilitou melhora na acurácia diagnóstica e com isso a redução da hospitalização desnecessária das gestantes com suspeita de PE (FIGUEIRA *et al.*, 2018).

Avanços na compreensão do equilíbrio entre fatores angiogênicos e antiangiogênicos na PE são estimulantes e oferecem perspectivas promissoras para o futuro manejo clínico da doença. Eddy *et al.*, 2018, demonstraram que o tratamento com PIGF ou VEGF tem sido eficaz na atenuação da hipertensão e proteinúria em múltiplos modelos experimentais de PE. O VEGF, no entanto, pode ter riscos de toxicidade por overdose que não foram observados no tratamento com PIGF, sugerindo que o PIGF é uma opção terapêutica potencialmente mais segura (EDDY; BIDWELL; GEORGE, 2018).

Nossos achados confirmam a hipótese de que as proteínas angiogênicas circulantes podem ter um papel biológico importante na PE (EDDY; BIDWELL; GEORGE, 2018). Dados de estudos longitudinais e prospectivos que produzem determinações seriadas dessas moléculas ao longo dos três trimestres da gestação são necessários para esclarecer a relevância desses marcadores na PE. Cumpre ressaltar a complexidade da realização de estudos longitudinais, o que pode desestimular pesquisadores e dificultar a compreensão do balanço angiogênico para fisiopatologia ou diagnóstico do PE. Essa é certamente a principal razão para a falta de estudos que tentam responder claramente essas questões.

7 CONCLUSÃO

- O PIGF é um bom marcador preditivo, porém não é um bom marcador de diagnóstico.
- O sFlt-1 não é um bom marcador preditivo, mas se apresenta como bom marcador de diagnóstico
- A razão sFlt-1/PIGF mostrou-se eficaz no diagnóstico de PE, sendo um bom marcador preditor e diagnóstico.
- Nenhum marcador se mostrou satisfatório para diferenciar PE precoce de PE tardia.
- O valor da razão sFlt-1/PIGF de 101,28 mostrou-se eficaz para a predição da PE no terceiro trimestre de gestação.
- Proteínas angiogênicas circulantes e a função endotelial desempenham um papel biológico importante na PE.
- Estudos prospectivos longitudinais, com determinações seriadas dessas moléculas em um número maior de amostras durante a gestação, são necessários para confirmar a relevância da razão sFlt-1/PIGF na predição da PE.

8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

São inúmeras as dificuldades para a realização de estudos longitudinais. Considerando que a PE não apresenta uma lógica clara (ou seja, pode não ocorrer em gestantes que apresentam vários fatores de risco, assim como pode manifestar-se em gestantes que não tinham fatores de risco identificáveis para a doença) é muito difícil prever quem desenvolverá a doença para ser incluída no estudo. Além disso, é bastante complexa a obtenção de quatro amostras de sangue ao longo da gestação, uma vez que essa é uma condição (especialmente na sua fase avançada), sujeita a certa limitação da gestante para cumprir sua agenda do pré-natal. Muitas vezes por motivos pessoais elas não comparecem as consultas impossibilitando a coleta das amostras. Deve-se considerar também que nem sempre o parto dessas gestantes será realizado no Hospital das Clínicas. Esses motivos justificam o número reduzido de gestantes que desenvolvem PE e o número reduzido de amostras de sangue em cada período gestacional, o que constitui uma limitação do estudo. Além dos motivos acima citados, devido a frequência de gestantes que desenvolvem PE (2-8%) um tamanho amostral adequado teria que incluir um número muito grande de pacientes o que limita o estudo.

9 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS

Um novo estudo longitudinal, com o mesmo desenho do presente estudo, foi iniciado em 2017 do Hospital das Clínicas (HC) – UFMG, numa parceria do grupo de pesquisa em PE da DACT/Faculdade de Farmácia/UFMG e pesquisadores do Depto. De Obstetrícia/ Faculdade de Medicina/UFMG.

A experiência obtida com o presente estudo está sendo valiosa para alcançar o objetivo de aumentar o número de participantes do estudo e não perder coletas de sangue. As gestantes estão sendo abordadas no Ambulatório Jenny Faria, quando comparecem à reunião, coordenada pela enfermagem, para acolhida ao pré-natal do HC. Um número maior de estudantes, de diferentes Programas de Pós-graduação, está envolvido nesse novo estudo que além da coleta seriada de sangue em EDTA, citrato de sódio e sem anticoagulante ao longo da gestação, prevê a coleta de fragmentos de placenta e sangue do cordão umbilical após o parto. Constituem perspectivas desse projeto realizar um estudo bem mais completo, visando elucidar as alterações hemostáticas, inflamatórias e da angiogênese na PE, bem como investigar a relevância de mutações e polimorfismos, em diversos genes, para ocorrência dessa doença.

Outra perspectiva deste estudo é conseguir estabelecer estudos que possam propor intervenções clínicas às pacientes a fim de minimizar os efeitos dos sintomas da PE. Introduzir a administração de PIGF como em estudos realizados anteriormente ou investigar outras alternativas é um dos planos almejados.

REFERÊNCIAS

ALPOIM, P. N. *et al.* ADAMTS13, FVIII, von Willebrand factor, ABO blood group assessment in preeclampsia. *Clinica Chimica Acta*, v. 412, n. 23–24, p. 2162–2166, 2011.

ANDERSEN, L. B. *et al.* Prediction of preeclampsia with angiogenic biomarkers. Results from the prospective Odense Child Cohort. *Hypertension in Pregnancy*, v. 35, n. 3, p. 405–419, 2016.

BENTLEY, K.; CHAKRAVARTULA, S. The temporal basis of angiogenesis. *Philosophical Transactions B*, 2017.

BIRDIR, C. *et al.* Predictive value of sFlt-1, PlGF, sFlt-1/PlGF ratio and PAPP-A for late-onset preeclampsia and IUGR between 32 and 37 weeks of pregnancy. *Pregnancy Hypertension*, v. 12, n. February, p. 124–128, 2018.

BOELDT, D. S.; BIRD, I. M. Vascular adaptation in pregnancy and endothelial dysfunction in preeclampsia. *Journal of Endocrinology*, v. 232, n. 1, p. R27–R44, 2017.

BOUTIN, A. *et al.* First-Trimester Placental Growth Factor for the Prediction of Preeclampsia in Nulliparous Women: The Great Obstetrical Syndromes Cohort Study. *Fetal Diagnosis and Therapy*, v. 40, n. 5, p. 572–578, 2018.

BRANDÃO, A. H. F.; CABRAL, M. A.; CABRAL, A. C. V. O endotélio vascular e seu papel-chave na fisiopatologia da pré-eclâmpsia Resumo. 2011.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico: Revisão. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 17, n. 6, p. 417–423, 2002.

CHAIWORAPONGSA, T.; CHAEMSAITHONG, P.; YEO, L.; *et al.* Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nature Publishing Group*, v. 10, n. 10, p. 466–480, 2014..

CHAIWORAPONGSA, T.; CHAEMSAITHONG, P.; KORZENIEWSKI, S. J.; *et al.* Pre-eclampsia part 2: prediction, prevention and management. *Nature Reviews Nephrology*, v. 10, n. 9, p. 531–540, 2014.

- CHAU, K.; HENNESSY, A.; MAKRIS, A. Placental growth factor and pre-eclampsia. *Journal of Human Hypertension*, v. 31, p. 782–786, 2017.
- CHUAH, T. *et al.* Serum sFlt-1/PIGF ratio has better diagnostic ability in early-compared to late-onset pre-eclampsia. *Journal of Perinatal Medicine*, p. 1–6, 2018.
- DEKKER, G.; ROBILLARD, P. Y.; ROBERTS, C. The etiology of preeclampsia: The role of the father. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 89, n. 2, p. 126–132, 2011.
- DRÖGE, L. A. *et al.* Diagnosis of preeclampsia and fetal growth restriction with the sFlt-1/ PIGF ratio: diagnostic accuracy of the automated immunoassay Kryptor®. *Pregnancy and Hypertension*, 2017.
- EDDY, A. C.; BIDWELL, G. L.; GEORGE, E. M. Pro-angiogenic therapeutics for preeclampsia. *Biology of Sex Differences*, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2018.
- EHRlich, L. *et al.* Increased placental sFlt-1 but unchanged PIGF expression in late-onset preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*, v. 1955, n. May, p. 1–11, 2017.
- EHSANIPOOR, R. M. *et al.* Nitric Oxide and Carbon Monoxide Production and Metabolism in Preeclampsia. *Reproductive Sciences*, v. 20, n. 5, p. 542–548, 2013.
- FAN, X. *et al.* Endometrial VEGF induces placental sFLT1 and leads to pregnancy complications. *Journal of Clinical Investigation*, v. 124, n. 11, p. 4941–4952, 2014.
- FIGUEIRA, S. F. *et al.* Economic evaluation of sFlt-1/PIGF ratio test in pre-eclampsia prediction and diagnosis in two Brazilian hospitals. *Pregnancy Hypertension*, v. 13, p. 30–36, 2018.
- FOIDART, J. M. *et al.* Dysregulation of anti-angiogenic agents (sFlt-1, PLGF, and sEndoglin) in preeclampsia-a step forward but not the definitive answer. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 82, n. 2, p. 106–111, 2009.
- GURNADI, J. I. *et al.* Difference of concentration of placental soluble fms-like tyrosine kinase-1(sFlt-1), placental growth factor (PIGF), and sFlt-1/PIGF ratio in severe preeclampsia and normal pregnancy. *BMC Research Notes*, v. 8, n. 1, p. 534, 2015.
- HAMMEROVA, L. *et al.* Longitudinal evaluation of markers of hemostasis in pregnancy. *Bratislavské lekárske listy*, v. 115, n. 3, p. 140–144, 2014.

HARMON, A. C. *et al.* The role of inflammation in the pathology of preeclampsia. *Clinical Science*, p. 409–419, 2016.

HERRAIZ, I. *et al.* Update on the Diagnosis and Prognosis of Preeclampsia with the Aid of the sFlt-1/ PIGF Ratio in Singleton Pregnancies. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 2017.

HOELLER, A. *et al.* Placental expression of sFlt-1 and PIGF in early preeclampsia vs . early IUGR vs . age-matched healthy pregnancies. *Hypertension in Pregnancy*, v. 1955, n. February, 2017.

HUANG, L.-T. *et al.* Roles of nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in pregnancy and fetal programming. *International journal of molecular sciences*, v. 13, n. 11, p. 14606–22, 2012.

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.

JIM, B.; KARUMANCHI, S. A. Preeclampsia: Pathogenesis, Prevention, and Long-Term Complications. *Seminars in Nephrology*, v. 37, n. 4, p. 386–397, 2017.

KARUMANCHI, S. A.; EPSTEIN, F. H. Placental ischemia and soluble fms-like tyrosine kinase 1: Cause or consequence of preeclampsia? *Kidney International*, v. 71, n. 10, p. 959–961, 2007.

KAWASHIMA, A. *et al.* Maternal smoking history enhances the expression of placental growth factor in invasive trophoblasts at early gestation despite cessation of smoking. *PLoS ONE*, v. 10, n. 7, p. 1–11, 2015.

KHALIL, A. *et al.* Longitudinal changes in maternal serum placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 in women at increased risk of pre-eclampsia. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, v. 47, n. 3, p. 324–331, 2016.

LAMBERT, G. *et al.* Preeclampsia: an update. *ACTA ANAESTHESIOLOGICA BELGICA* , p. 137–149, 2014.

LASKOWSKA, M. *et al.* A comparison of maternal serum levels of endothelial nitric oxide synthase, asymmetric dimethylarginine, and homocysteine in normal and preeclamptic pregnancies. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, v. 19, p. 430–7, 2013.

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, p. e6005, 2017.

LECARPENTIER, E.; TSATSARIS, V. Angiogenic balance (sFlt-1/PlGF) and preeclampsia Balance. *Endocrinol (Paris)*, jan. 2016.

LEVINE RJ, MAYNARD SE, Q. C. *et al.* Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia. *New England Journal of Medicine*, v. 350, n. 7, p. 672–683, 2004.

LOPES, B. *et al.* Biostatistics: Fundamental concepts and practical applications. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, v. 73, n. 1, p. 16–22, 2014.

MARTINEZ-FIERRO, M. L. *et al.* Current model systems for the study of preeclampsia. *Experimental Biology and Medicine*, v. 243, n. 6, p. 576–585, 2018.

MATHUR, P. *et al.* A Prospective Study of Placental Growth Factor Assay as a Novel Biomarker in Predicting Early-Onset Preeclampsia in High-Risk Patients. *Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, v. 66, p. 98–103, 2016.

MCEL RATH, T. F. *et al.* Longitudinal evaluation of predictive value for preeclampsia of circulating angiogenic factors through pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 207, n. 5, p. 407.e1-407.e7, 2012.

MOFFETT-KING, A. Natural killer cells and pregnancy. *Nature Publishing Group*, v. 2, n. September, p. 656–664, 2002.

MOL, B. W. J. *et al.* Pre-eclampsia. *The Lancet*, v. 6736, n. 15, p. 1–13, 2015.

MUNDIM, G. J. *et al.* Assessment of angiogenesis modulators in pregnant women with pre-eclampsia: a case-control study. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, v. 293, n. 2, p. 369–375, 2016.

NADERI, S.; TSAI, S. A.; KHANDELWAL, A. Hypertensive Disorders of Pregnancy. *Curr Atheroscler Rep*, n. Clinical Practice Guideline No 15, p. 17–22, 2017.

NANJO, S. *et al.* Levels of serum-circulating angiogenic factors within 1 week prior to delivery are closely related to conditions of pregnant women with pre-eclampsia, gestational hypertension, and/or fetal growth restriction. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, p. 1–10, 2017.

NEJABATI, H. R. *et al.* Placental growth factor (PlGF) as an angiogenic/inflammatory switcher: lesson from early pregnancy losses. *Gynecological Endocrinology*, v. 3590, n. April, p. 1–7, 2017.

NERLYNE, K. D.; LYNDE, G. C. Update in the Management of Patients with Preeclampsia. *Anesthesiology Clin*, v. 35, p. 95–106, 2016.

OHKUCHI, A. *et al.* Evaluation of a new and automated electrochemiluminescence immunoassay for plasma sFlt-1 and PlGF levels in women with preeclampsia. *Hypertension Research*, n. February, p. 422–427, 2010.

OMS. *Recomendações da OMS para a Prevenção e tratamento da pré-eclâmpsia e da eclâmpsia*. [S.l.: s.n.], 2011.

PALMER, K. R. *et al.* Maternal plasma concentrations of the placental specific sFLT-1 variant, sFLT-1 e15a, in fetal growth restriction and preeclampsia. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, v. 28, p. 1–5, 2016.

PALMER, K.; TONG, S.; KAITU'U-LINO, T. Placental specific sFLT-1: role in pre-eclamptic pathophysiology and its translational possibilities for clinical prediction and diagnosis. *Mol. Hum. Reprod. Advance*, 2016.

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

RAYMOND, D.; PETERSON, E. A Critical Review of Early-Onset and Late-Onset Preeclampsia. *Obstetrical & Gynecological Survey*, v. 66, n. 8, p. 497–506, 2011.

REDMAN, C. W. G.; SARGENT, I. L. Immunology of Pre-Eclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 63, n. 6, p. 534–543, 2010.

RIOS, D. R. A. *et al.* Increased Levels of sENG and sVCAM-1 and Decreased Levels of VEGF in Severe Preeclampsia. *American Journal of Hypertension*, v. 29, n. 11, p. 1307–1310, 2016.

ROCCELLA, E. J. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 183, n. 1, p. 1–22, 2000.

SILVA, T. H. Á. DA *et al.* Agentes antitumorais inibidores da angiogênese: modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha_3\beta_1$. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 1, p. 1–17, 2007.

SOVIO, U. *et al.* Preeclampsia 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*, 2017.

STEPAN, H. *et al.* Implementation of the sFlt-1/PIGF ratio for prediction and diagnosis of pre-eclampsia in singleton pregnancy: Implications for clinical practice. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, v. 45, n. 3, p. 241–246, 2015.

SUGIMOTO, H. *et al.* Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 15, p. 12605–12608, 2003.

TANG, P. *et al.* Use of serum and urinary soluble sFlt-1 and PLGF in the diagnosis of preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*, v. 1955, n. November, 2016.

TEIXEIRA, P. G. *et al.* Placental Growth Factor (PIGF) Is a Surrogate Marker in Preeclamptic Hypertension. *Hypertension in Pregnancy*, v. 27, n. 1, p. 65–73, 2008.

TEIXEIRA, P. G. *et al.* Presymptomatic prediction of preeclampsia with angiogenic factors, in high risk pregnant women. *Hypertension in Pregnancy*, v. 32, n. 3, p. 312–320, 2013.

THADHANI, R. *et al.* First Trimester Placental Growth Factor and Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase 1 and Risk for Preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 89, n. 2, p. 770–775, 2004.

TRANQUILLI, A. L. *et al.* The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertension*, v. 4, n. 2, p. 97–104, 2014.

VERLOHREN, S.; STEPAN, H.; DECHEND, R. Angiogenic Growth Factors in The Diagnosis and Prediction of Pre-Eclampsia. *Clinical science*, v. 122, n. 2, p. 43–52, 2012.

VIKSE, B. E. *et al.* Preeclampsia and the risk of end-stage renal disease. *New England Journal of Medicine*, v. 359, n. 8, p. 800–9, 2008.

VIRDIS, A. *et al.* Endothelial dysfunction and vascular disease in later life. *Maturitas*, v. 67, n. 1, p. 20–24, 2010.

WALLUKAT, G. *et al.* Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *Journal of Clinical Investigation*, v. 103, n. 7, p. 945–952, 1999.

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.

WU, P. *et al.* Early Pregnancy Biomarkers in Pre-Eclampsia : A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 9, p. 23035–23056, 2015.

ZEISLER, H. *et al.* Predictive Value of the sFlt-1: PIGF Ratio in Women With Suspected Preeclampsia. *Obstetrical & Gynecological Survey*, v. 71, n. 5, p. 273–274, 2016.

ZHAO, M. *et al.* Dual-cutoff of sFlt-1 / PIGF ratio in the stratification of preeclampsia : a systematic review and meta-analysis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, v. 295, n. 5, p. 1079–1087, 2017.

ZHONG, Y.; ZHU, F.; DING, Y. Serum screening in first trimester to predict pre-eclampsia, small for gestational age and preterm delivery: systematic review and meta-analysis. *BMC pregnancy and childbirth*, v. 15, p. 191, 2015.

ANEXOS**Anexo A- Parecer de aprovação COEP – UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

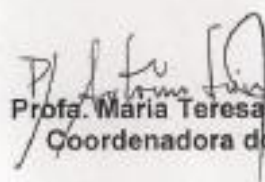
Parecer nº. ETIC 0530.0.203.000-09

**Interessado(a): Profa. Luci Mara Sant'Ana Dusse
Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 16 de dezembro de 2009, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação do polimorfismo do gene da NO-sintase endotelial e da síntese de óxido nítrico na pré-eclâmpsia"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo B - Parecer de aprovação COEP – UFMG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Parecer nº. ETIC 0618.0.203.000-10

**Interessado(a): Profa. Luci Maria Sant'Ana Dusse
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 26 de abril de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Pré-eclâmpsia: inter-relação dos sistemas hemostático e inflamatório**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


**Prof. Maria Teresa Marques Amáral
Coordenadora do COEP-UFMG**