

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

**FLÁVIA CAMPOS LUCENA**

**AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA COAGULAÇÃO E FIBRINÓLISE EM**  
**GESTANTES PORTADORAS DE FATORES DE RISCO PARA PRÉ-**  
**ECLÂMPsia**

**Belo Horizonte - MG**  
**2015**

**FLÁVIA CAMPOS LUCENA**

**AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA COAGULAÇÃO E FIBRINÓLISE EM  
GESTANTES PORTADORAS DE FATORES DE RISCO PARA PRÉ-  
ECLÂMPSIA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obter o grau de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luci Maria S. Dusse

**Belo Horizonte - MG  
2015**

*Dedico este trabalho*

*A Deus, por iluminar os meus caminhos e estar sempre presente em minha vida.*

*A minha mãe, pelo apoio, amor incondicional e exemplo de vida.*

*Ao Daniel, pelo amor, companheirismo e incentivo em todos os momentos.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida. Por me guiar, dar forças e discernimento em minhas escolhas.

A Professora e orientadora Luci Maria Sant'Ana Dusse, pelos ensinamentos, tolerância, dedicação, confiança e incentivo em todos os momentos.

Aos pesquisadores do Centro de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas da UFMG que idealizaram este estudo longitudinal envolvendo gestantes de risco para pré-eclâmpsia, coletaram as amostras e cederam uma alíquota para a realização do presente estudo.

Ao Professor Vicente de Toledo, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelo exemplo de profissionalismo e apoio.

Aos professores, funcionários e amigos da primeira turma do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG pela convivência, amizade e apoio para o desenvolvimento deste projeto.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG, pela atenção e cortesia.

A FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro.

A Rejane Diniz, pela inestimável e competente orientação nas análises estatísticas.

A Carla Dourado, coordenadora e responsável técnica da Agência Transfusional da Santa Casa de Belo Horizonte, pela colaboração, compreensão e amizade em todos os momentos turbulentos.

A minha mãe, por sempre acreditar na minha competência e pelo apoio incondicional. Muito obrigada pelo amor e pela presença constante em todos os momentos da minha vida.

Ao Daniel, meu amor, por estar sempre ao meu lado me acalmando, incentivando e tornando meus dias mais felizes. Muito obrigada pelo companheirismo, compreensão e amor.

A minha querida prima Ana Carolina, pelo apoio, sábios conselhos e parceria ao longo da minha existência.

A todos os meus amigos e familiares, pela motivação e por estarem sempre presentes em minha vida.

**“Nós somos aquilo que fazemos repetidamente. Excelência, então, não é um modo de agir, mas um hábito.”**

**Aristóteles**

## RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é caracterizada por pressão sanguínea sistólica  $\geq 140$  mmHg ou diastólica  $\geq 90$  mmHg, em no mínimo duas ocasiões (o intervalo entre as medições não deve ser inferior a 6 horas) e proteinúria (excreção de proteína  $\geq 0,3$  g em urina de 24 horas ou  $\geq 30$  mg/dL, ou seja,  $\geq 1+$  pelo método qualitativo de fita, em amostras isoladas) em gestantes normotensas, após a vigésima semana de gestação. A hipertensão, na ausência de proteinúria, é caracterizada como PE se associada à trombocitopenia, insuficiência renal, alteração hepática, edema pulmonar ou sintomas cerebrais ou visuais. O objetivo deste estudo foi avaliar longitudinalmente marcadores da coagulação e fibrinólise em gestantes portadoras de fatores de risco para PE, que desenvolveram ou não a doença. Foram avaliadas 23 amostras de 11 gestantes que desenvolveram PE e 55 amostras de 17 que não desenvolveram a doença, nos períodos gestacionais 12-19, 20-29, 30-34 e 35-40 semanas. Os níveis plasmáticos de D-Di e PAI-1 foram determinados por ELISA (Sekisui Diagnostics). Não houve diferença significativa para os níveis plasmáticos de D-Di e PAI-1 nas gestantes que desenvolveram PE em relação às que não desenvolveram a doença, nos quatro períodos gestacionais avaliados. No entanto, foi obtido um aumento significativo nos níveis de D-Di nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, comparando os períodos gestacionais 12-19x30-34 ( $p=0,045$  e  $p=0,001$ ), 12-19x35-40 ( $p<0,001$  e  $p=0,000$ ), 20-29x30-34 ( $p=0,048$  e  $p=0,003$ ) e 20-29x35-40 semanas ( $p=0,030$  e  $p=0,001$ ), respectivamente. Foi também obtido um aumento significativo nos níveis de PAI-1 nas gestantes que desenvolveram PE, comparando os períodos gestacionais 35-40x12-19 ( $p=0,001$ ), 35-40x20-29 ( $p<0,001$ ) e 35-40x30-34 semanas ( $p<0,001$ ) e nas gestantes que não desenvolveram a doença, nos períodos 12-19x20-29 ( $p=0,004$ ), 12-19x30-34 ( $p<0,001$ ), 12-19x35-40 ( $p=0,001$ ), 20-29x35-40 ( $p=0,009$ ) e 30-34x35-40 semanas ( $p=0,002$ ). Os dados obtidos permitem concluir que houve uma tendência de aumento dos níveis plasmáticos de D-Di e PAI-1 nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, ao longo da gestação, e esse aumento foi mais evidente nas que desenvolveram a doença. Esses dados permitem sugerir que os marcadores plasmáticos D-Di e PAI-1 são candidatos promissores para integrar um algoritmo diagnóstico para a PE, a ser aplicado após um *score* clínico e associados à exames de imagens. O principal mérito do presente estudo é encorajar novos projetos, criteriosamente elaborados e cercados de medidas para que não haja perda de participantes ao longo do mesmo, de forma a contabilizar um número de gestantes e de amostras de sangue em cada período gestacional suficientes para permitir, com segurança, a determinação dos *cut-off* de D-Di e PAI-1 para o diagnóstico precoce da doença. A determinação de D-Di indubitavelmente seria de grande valia para o diagnóstico de PE, sabendo que esse teste já está disponível nos laboratórios clínicos.

**Palavras-chave:** Pré-eclâmpsia; D-Dímero; PAI-1; Períodos gestacionais.

## ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is characterized by systolic blood pressure  $\geq 140$ mmHg or diastolic  $\geq 90$ mmHg on at least two occasions (the interval between measurements should not be less than 6 hours) and proteinuria (protein excretion  $\geq 0,3$ g in 24 hours urine or  $\geq 30$ mg/dL, so the qualitative method  $\geq 1+$  in isolated samples) in normotensive pregnant women, after the twentieth week of pregnancy. The pressure in the absence of proteinuria is characterized as PE is associated with thrombocytopenia, renal failure, abnormal liver, pulmonary edema, or cerebral or visual symptoms. The objective of this study was to evaluate longitudinally markers of coagulation and fibrinolysis in pregnant women with risk factors for PE, who developed the disease or not. It were evaluated 23 samples from 11 pregnant women who developed PE and 55 samples of 17 who did not develop the disease in gestational periods 12-19, 20-29, 30-34 and 35-40 weeks. Plasma levels of D-Di, and PAI-1 were determined by ELISA (Sekisui Diagnostics). There was no significant difference in plasma levels of D-Di and PAI-1 in pregnant women who developed PE compared with those who did not develop the disease in four gestational periods evaluated. However, a significant increase in D-Di levels in pregnant that developed PE or not has been obtained by comparing the 12-19x30-34 gestational periods ( $P=0.045$  and  $P=0.001$ ), 12-19x35-40 ( $P<0.001$  and  $P=0.000$ ), 20-29x30-34 ( $P=0.048$  and  $P=0.003$ ) and 20-29x35-40 weeks ( $P=0.030$  and  $P=0.001$ ), respectively. It was also obtained a significant increase in PAI-1 levels in pregnant women who developed PE, comparing the gestational periods 35-40x12-19 ( $P=0.001$ ), 35-40x20-29 ( $P<0.001$ ) and 35-40x30-34 weeks ( $P<0.001$ ) and in women who did not develop the disease in 12-19x20-29 periods ( $P=0.004$ ), 12-19x30-34 ( $P<0.001$ ), 12-19x35-40 ( $P=0.001$ ), 20-29x35-40 ( $P=0.009$ ) and 30-34x35-40 weeks ( $P=0.002$ ). The data support the conclusion that there was a trend of increased plasma levels of D-Di and PAI-1 in pregnant women who developed and who did not develop PE, during pregnancy, and this increase was more evident in those who developed the disease. These data suggest that plasma markers D-Di and PAI-1 are promising candidates to integrate a diagnostic algorithm for PE, to be applied after a clinical score and associated with imaging tests. The main merit of this study is to encourage new projects, carefully designed and surrounded by measures to ensure that there is no loss of participants over the same in order to account for a number of pregnant women and blood samples in each gestational period sufficient to allow, safely, determining the cut-off D-Di, and PAI-1 for the early diagnosis of the disease. The determination of D-Di would undoubtedly be of great value for PE diagnosis, knowing that this test is now available in clinical laboratories.

**Keywords:** Preeclampsia; D-dimer; PAI-1; Gestational periods.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1- Novo modelo celular da cascata da coagulação.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 2- Apresentação esquemática do sistema fibrinolítico.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 3- Representação esquemática da formação dos dímeros D.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 4- Quebra da fibrina e formação do D-Di.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 5- Representação esquemática do princípio dos três métodos disponíveis para determinação plasmática do D-Di.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 6- Comparação dos níveis plasmáticos de D-Di (ng/mL) nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, nos quatro períodos gestacionais avaliados.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 7- Níveis plasmáticos de D-Di (ng/mL) nos quatro períodos gestacionais, no grupo de gestantes que desenvolveram PE.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 8- Níveis plasmáticos de D-Di (ng/mL) nos quatro períodos gestacionais, no grupo de gestantes que não desenvolveram PE.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 9- Níveis plasmáticos de D-Di (ng/mL) nos grupos de gestantes que desenvolveram PE e que não desenvolveram PE, nos quatro períodos gestacionais avaliados.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 10- Comparação dos níveis plasmáticos de PAI-1 (ng/mL) nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, nos quatro períodos gestacionais avaliados.....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 11- Níveis plasmáticos de PAI-1 (ng/mL), nos quatro períodos gestacionais avaliados, nas gestantes que desenvolveram PE.....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 12- Níveis plasmáticos de PAI-1 (ng/mL) nos quatro períodos gestacionais, no grupo de gestantes que não desenvolveram PE.....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 13- Níveis plasmáticos de PAI-1 (ng/mL) nas gestantes que desenvolveram PE e que não desenvolveram PE, nos quatro períodos gestacionais avaliados.....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1- Características clínicas e epidemiológicas das participantes do estudo.....</b>	<b>51</b>
<b>Tabela 2- Níveis plasmáticos de D-Di nas gestantes que desenvolveram PE, nos quatro períodos da gestação (12-19, 20-29, 30-34 e 35-40 semanas).....</b>	<b>53</b>
<b>Tabela 3- Níveis plasmáticos de D-Di nas gestantes que não desenvolveram PE, nos quatro períodos da gestação (12-19, 20-29, 30-34 e 35-40 semanas).....</b>	<b>53</b>
<b>Tabela 4- Níveis plasmáticos de D-Di nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, para cada período gestacional.....</b>	<b>54</b>
<b>Tabela 5- Comparação dos níveis plasmáticos de D-Di, nos quatro períodos gestacionais avaliados, das gestantes que desenvolveram PE.....</b>	<b>56</b>
<b>Tabela 6- Comparação dos níveis plasmáticos de D-Di, nos quatro períodos gestacionais avaliados, das gestantes que não desenvolveram PE.....</b>	<b>58</b>
<b>Tabela 7- Níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que desenvolveram PE, nos quatro períodos da gestação (12-19 semanas, 20-29 semanas, 30-34 semanas, 35-40 semanas).....</b>	<b>61</b>
<b>Tabela 8- Níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que não desenvolveram PE, nos quatro períodos da gestação (12-19 semanas, 20-29 semanas, 30-34 semanas, 35-40 semanas).....</b>	<b>61</b>
<b>Tabela 9- Níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, para cada período gestacional.....</b>	<b>62</b>
<b>Tabela 10- Comparação dos níveis plasmáticos de PAI-1, nos quatro períodos gestacionais avaliados, das gestantes que desenvolveram PE.....</b>	<b>64</b>
<b>Tabela 11- Comparação dos níveis plasmáticos de PAI-1, nos quatro períodos gestacionais avaliados, das gestantes que não desenvolveram PE.....</b>	<b>66</b>
<b>Tabela 12- Razão D-Di/PAI-1 nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, nos quatro períodos gestacionais.....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato transaminase
AT	Antitrombina
CIVD	Coagulação Intravascular Disseminada
D-Di	Dímero D
DHEG	Doença hipertensiva específica da gravidez
DP	Desvio-padrão
ELFA	Ensaio imuno-enzimático fluorescente
TEP	Tromboembolismo pulmonar
ELISA	Ensaio imuno-enzimático
F I	Fator I / Fibrinogênio
F II	Fator II / Protrombina
F IIa	Fator II ativado / Trombina
F V	Fator V
F Va	Fator V ativado
F VII	Fator VII
F VIIa	Fator VII ativado
F VIII	Fator VIII
F VIIIa	Fator VIII ativado
F IX	Fator IX
F IXa	Fator IX ativado
F IXa/F VIIIa	Complexo tenase
F X	Fator X
F Xa	Fator X ativado
F Xa/F Va	Complexo protrombinase
F XI	Fator XI
F XIa	Fator XI ativado
F XII	Fator XII
F XIIa	Fator XII ativado
F XIII	Fator XIII

F XIIIa	Fator XIII ativado
FT	Fator tissular
FvW	Fator de Von Willebrand
GP	Glicoproteína
HELLP	<i>Hemolysis elevated liver enzymes, and low platelet</i>
IL-1	Interleucina-1
IRMA	Ensaio imuno-radiométrico
LPS	Lipopolissacárides
SimpliRED	Ensaio de aglutinação com sangue total
PA	Pressão arterial
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
PAI-2	Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 2
PDF	Produtos de degradação da fibrina
PE	Pré-eclâmpsia
PIGF	Fator de crescimento placentário
s-FIt1	Formas solúveis de tirosina quinase 1
TEV	Tromboembolismo venoso
TFPI	Fator inibidor da via do fator tissular
TGF- $\beta$	Fator de crescimento tumoral $\beta$
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
t-PA	Ativador tecidual do plasminogênio
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativado
TVP	Trombose venosa profunda
u-PA	Ativador do plasminogênio tipo uroquinase
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Pré-eclâmpsia.....	17
2.1.2 <u>Classificação</u> .....	18
2.1.3 <u>Fatores de risco</u> .....	19
2.1.4 <u>Fisiopatologia e patogênese</u> .....	20
2.2 Hemostasia.....	21
2.2.1 <u>Sistema Hemostático</u> .....	21
2.2.2 <u>Sistema Fibrinolítico</u> .....	25
2.3 Dímero D.....	27
2.3.1 <u>Determinação laboratorial de D-Di</u> .....	28
2.3.2 <u>D-Di e exclusão de tromboembolismo venoso</u> .....	30
2.4 PAI-1.....	30
2.5 D-Di na gestação normal.....	32
2.6 PAI-1 na gestação normal.....	37
2.7 D-Di na PE.....	38
2.8 PAI-1 na PE.....	41
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1 Casuística.....	45
4.1.1 <u>Aspectos éticos</u> .....	45
4.1.2 <u>Seleção das participantes do estudo</u> .....	45
4.1.2.1 <u>Fatores de risco para PE</u> .....	45
4.2 Amostra biológica.....	46
4.3 Métodos.....	47
4.3.1 <u>Determinação do D-Di</u> .....	47
4.3.2 <u>Determinação do PAI-1</u> .....	48
4.4 Análise estatística.....	49
5 RESULTADOS.....	51
5.1 Características clínicas e epidemiológicas dos grupos avaliados.....	51

5.2 Níveis plasmáticos de D-Di nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, em cada período gestacional.....	53
5.3 Comparação dos níveis plasmáticos de D-Di em cada gestante (que desenvolveram e que não desenvolveram PE), nos quatro períodos gestacionais avaliados.....	56
5.4 Níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, em cada período gestacional.....	60
5.5 Comparação dos níveis plasmáticos de PAI-1 em cada gestante (que desenvolveu e que não desenvolveu PE), nos quatro períodos gestacionais avaliados.....	64
5.6 Razão D-Di/PAI-1 nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, nos quatro períodos gestacionais avaliados.....	68
6 DISCUSSÃO.....	70
6.1 Considerações iniciais.....	70
6.2 Características clínicas e epidemiológicas dos grupos avaliados.....	71
6.3 Níveis plasmáticos de D-Di nas gestantes avaliadas.....	73
6.4 Níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes avaliadas.....	77
6.5 Razão D-Di/PAI-1 nas gestantes avaliadas.....	80
6.6 Considerações finais.....	81
7 CONCLUSÕES.....	83
8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	84
9 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS .....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais.....	97

## 1 Introdução e Relevância

A pré-eclâmpsia (PE) constitui a principal causa de morte materna em diversos países do mundo e contribui significativamente para a prematuridade, o baixo peso fetal e o aumento da mortalidade neonatal. Esta doença apresenta um elevado custo social, uma vez que, frequentemente, resulta na internação da gestante e do recém-nascido por vários dias.

A PE é caracterizada por pressão sanguínea sistólica  $\geq 140$  mmHg ou diastólica  $\geq 90$  mmHg, em no mínimo duas ocasiões (o intervalo entre as medições não deve ser inferior a 6 horas) e proteinúria (excreção de proteína  $\geq 0,3$  g em urina de 24 horas ou  $\geq 30$  mg/dL, ou seja,  $\geq 1+$  pelo método qualitativo de fita, em amostras isoladas) em gestantes normotensas, após a vigésima semana de gestação. Na ausência de proteinúria, a hipertensão é caracterizada como PE, se houver o aparecimento de qualquer uma das seguintes alterações: a) trombocitopenia (contagem de plaquetas  $< 100.000/\text{mm}^3$ ), b) insuficiência renal (creatinina  $> 1,1$  mg/dL ou um aumento de duas vezes dos níveis plasmáticos de creatinina, na ausência de doença renal de base), c) elevação das enzimas hepáticas (níveis de transaminases hepáticas aumentados em duas vezes), d) edema pulmonar ou e) sintomas cerebrais ou visuais.

A doença pode manifestar também em gestantes com diagnóstico prévio de hipertensão arterial, quando é chamada de PE superposta. Nesses casos ocorre agravamento da hipertensão, com aumento de pelo menos 15 mmHg da pressão arterial diastólica em relação aos níveis prévios. O acompanhamento médico das gestantes deve ser criterioso e é fundamental para o sucesso da gravidez. Pode ainda ocorrer hipertensão gestacional, que não é acompanhada de proteinúria e sintomas clássicos, que não se caracteriza como PE.

Atualmente, a idade gestacional, na qual surgem os sintomas da doença, é considerado um referencial clínico importante, refletindo os mecanismos etiopatogênicos que se iniciam em momentos diferentes da gestação. Dessa forma, a PE é classificada como de início precoce, quando os sintomas clínicos surgem antes da 34ª semana gestacional e de início tardio, quando os sintomas surgem a partir da 34ª semana gestacional. A PE tardia é a mais frequente e geralmente está associada à placentação adequada ou levemente comprometida. A PE precoce está

associada à forma clinicamente mais grave, refletindo lesões isquêmicas placentárias.

A etiologia da PE ainda é desconhecida. O único tratamento efetivo consiste na interrupção da gravidez e remoção completa da placenta. Em muitos casos, esta medida precisa ser tomada prematuramente, visando garantir a vida da mãe, do bebê ou de ambos.

A gravidez normal está associada a complexas alterações da hemostasia que resultam em um estado de hipercoagulabilidade sanguínea. Tais alterações ocorrem ao longo da gravidez e visam uma ação eficaz na zona de inserção placentária no momento do parto, de modo a prevenir uma hemorragia excessiva. A PE está associada a um estado de hipercoagulabilidade ainda mais evidente que a condição fisiológica da gravidez. A manifestação mais característica dessa doença é a acentuada vasoconstrição arteriolar, que acarreta um aumento da resistência vascular periférica e tem como consequência o aparecimento da hipertensão. Um dos mecanismos compensatórios da doença consiste na perda de plasma para o espaço extravascular, resultando no aparecimento de edema e hemoconcentração, que favorece a ativação das plaquetas e fatores da coagulação, determinando a hipercoagulabilidade do sangue. Com a evolução da doença, pode ocorrer deposição de fibrina na microvasculatura, com consequente comprometimento da perfusão de vários órgãos, como placenta, rins, fígado cérebro e pulmões.

O Dímero D (D-Di) constitui o menor fragmento da digestão do coágulo de fibrina que resulta da ação da plasmina. O D-Di é um indicador global de ativação da coagulação e da fibrinólise, constituindo um marcador sensível da formação e degradação da fibrina.

A determinação laboratorial dos níveis plasmáticos de D-Di tem sido utilizada para a investigação dos eventos tromboembólicos como o tromboembolismo venoso (TEV) e tromboembolismo pulmonar (TEP), quando seus níveis aumentam consideravelmente. No entanto, níveis elevados de D-Di não confirmam o diagnóstico dessas doenças. A principal aplicação clínica do D-Di consiste na exclusão de TEV e TEP, quando seus níveis estão normais (inferiores a 500ng/mL) possuindo, portanto, elevado valor preditivo negativo para o diagnóstico dessas condições. Diversos estudos têm demonstrado um aumento do D-Di em gestantes normotensas em relação às mulheres não gestantes e em gestantes pré-eclâmpticas em relação às normotensas, no terceiro trimestre de gestação.

O inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) é o principal inibidor da ativação do plasminogênio em plasmina, a enzima responsável pela lise do coágulo de fibrina. O PAI-1 inibe o ativador tecidual do plasminogênio (t-PA), o ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA) e a plasmina e, dessa forma, prolonga a permanência do coágulo de fibrina no vaso sanguíneo. O PAI-1 é secretado principalmente pelas células endoteliais e pelos adipócitos. Os resultados dos estudos relativos ao sistema fibrinolítico na PE são conflitantes e um aumento, redução ou não alteração dos marcadores de fibrinólise nas gestantes pré-eclâmplicas em relação às normotensas têm sido relatados na literatura.

A hipótese que norteia este estudo admite que marcadores da coagulação e fibrinólise possam constituir ferramentas importantes para o diagnóstico precoce da PE. A determinação dos níveis plasmáticos de D-Di e PAI-1, antes do aparecimento dos sintomas clínicos da doença são de fundamental importância para estabelecer o valor diagnóstico e prognóstico desses marcadores.

Uma grande limitação dos estudos referentes à PE consiste na dificuldade do estabelecimento do seu diagnóstico, principalmente precocemente. O sucesso do diagnóstico clínico da PE depende do cuidado de como se procura obtê-lo. Dessa forma, é fundamental, uma anamnese bem feita, bem como um exame clínico-laboratorial rigoroso. O diagnóstico precoce da PE permitiria a antecipação do tratamento e acompanhamento do prognóstico da gestante e feto.

Considerando a não existência de marcadores laboratoriais para o diagnóstico precoce da PE, a complexidade dos seus mecanismos patogênicos e as lacunas existentes na literatura acerca do entendimento dessa doença, este estudo reveste-se de grande importância e poderá gerar conhecimentos para aprimorar o diagnóstico precoce e prognóstico da doença.

Cumprе ressaltar que este é o segundo estudo da literatura que avaliou os níveis plasmáticos de D-Di e PAI-1 ao longo da gestação. A execução de projetos que visam o acompanhamento de gestantes ao longo da gestação reveste-se de grande dificuldade, especialmente no serviço público no Brasil, dado a chance de perda das gestantes inicialmente envolvidas no estudo, ao longo do mesmo.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia (PE) é uma doença complexa e de etiologia ainda não estabelecida. Constitui a principal causa de morte materna em diversos países do mundo e contribui significativamente para a prematuridade, o baixo peso fetal e o aumento da mortalidade neonatal (GHULMIYYAH *et al.*,2012). Em 2000, o *Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy* definiu que a PE caracterizava-se por pressão sanguínea sistólica  $\geq 140$ mmHg ou diastólica  $\geq 90$ mmHg, em no mínimo duas ocasiões (o intervalo entre as medições não deve ser inferior a 6 horas) e proteinúria (excreção de proteína  $\geq 0,3$ g em urina de 24 horas ou  $\geq 30$ mg/dL, ou seja,  $\geq 1+$  pelo método qualitativo de fita, em amostras isoladas) em gestantes normotensas, após a vigésima semana de gestação.

Recentemente, o *American College of Obstetricians and Gynecologists* (2013) reviu os critérios de diagnóstico de PE e admitiu que a hipertensão como anteriormente definida, mesmo na ausência de proteinúria, é caracterizada como PE, se houver o aparecimento de qualquer uma das seguintes alterações: a) trombocitopenia (contagem de plaquetas  $< 100.000/\text{mm}^3$ ), b) insuficiência renal (creatinina  $> 1,1$ mg/dL ou um aumento de duas vezes dos níveis plasmáticos de creatinina, na ausência de doença renal de base), c) elevação das enzimas hepáticas (níveis de transaminases hepáticas aumentados em duas vezes), d) edema pulmonar ou e) sintomas cerebrais ou visuais.

A PE pode manifestar também em gestantes com diagnóstico prévio de hipertensão arterial, quando é chamada de PE superposta. Nesses casos ocorre agravamento da hipertensão, com aumento de pelo menos 15mmHg da pressão arterial (PA) diastólica em relação aos níveis prévios, além do surgimento de proteinúria e dos sintomas clínicos da doença. O acompanhamento médico dessas gestantes deve ser criterioso e é fundamental para o sucesso da gravidez. Pode ainda ocorrer hipertensão gestacional, que não é acompanhada de proteinúria e dos sintomas clínicos clássicos e não se caracteriza como PE (REZENDE *et al.*, 2005).

O único tratamento efetivo para a PE consiste na interrupção da gravidez e remoção completa da placenta. Em muitos casos, esta medida precisa ser tomada

prematuramente, visando garantir a vida da mãe, do bebê ou de ambos (Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, 2000).

A PE pode evoluir para quadros mais graves como eclâmpsia (com surgimento de alterações neurológicas, convulsões, coma e morte), síndrome HELLP (hemólise, elevação das enzimas hepáticas e plaquetopenia) ou coagulação intravascular disseminada (CID) (SCHUILING *et al.*, 1997; SIBAI *et al.*, 2005).

### **2.1.2 Classificação**

A literatura revela que há mais de 30 anos foi proposta a classificação da PE com base na idade gestacional em que surgem as manifestações clínicas. No entanto, apenas nos últimos anos essa classificação foi amplamente aceita. Atualmente, a idade gestacional é considerada um referencial clínico que caracteriza entidades distintas da doença, refletindo os mecanismos etiopatogênicos que se iniciam em momentos diferentes da gestação. Essa classificação distingue a PE de início precoce, na qual os sintomas clínicos surgem antes da 34ª semana gestacional e de início tardio, quando os sintomas surgem a partir da 34ª semana gestacional (DEKKER *et al.*, 1995; VON DADELSZEN *et al.*, 2003).

A PE tardia é a mais frequente e geralmente é associada à placentação adequada ou levemente comprometida (DEKKER *et al.*, 1995). Caracteriza-se por ausência ou leve resistência ao fluxo nas artérias uterinas, menor comprometimento do crescimento fetal e resultados perinatais mais favoráveis (HUPPERTZ, 2008). Admite-se que essa forma é decorrente da liberação de produtos da placenta que interagem com o endotélio vascular, desencadeando lesão endotelial sistêmica, exacerbação de resposta inflamatória materna e liberação de agentes vasopressores (SIBAI *et al.*, 2008).

A PE precoce, por sua vez, está associada à forma clinicamente mais grave, refletindo lesões isquêmicas placentárias. Seu componente genético é mais acentuado, há maior taxa de recorrência e tem pior prognóstico para a gestante e o feto (DEKKER *et al.*, 1995; VON DADELSZEN *et al.*, 2003; ROBERTS *et al.*, 2008). A PE precoce está associada à restrição do crescimento intrauterino e a alterações do doppler das artérias uterinas (SIBAI *et al.*, 2008). Tem sido admitido que o desequilíbrio entre os fatores pró e anti-angiogênicos antecede o aparecimento dos

sinais clínicos da PE e tem sido considerado um marcador promissor da forma precoce da PE (LAMBERT-MESSELIAN *et al.*, 2009; COWANS *et al.*, 2010).

O surgimento dos sintomas da PE antes da 24ª semana está associado à elevada morbidade materna e perinatal e a chance de 50% de recorrência em gestações subsequentes. O aumento da incidência de hipertensão crônica no futuro também tem sido relatado, além do aumento dos níveis de microalbuminúria, um importante marcador de predição de cardiopatia isquêmica (JIM *et al.*, 2010).

### **2.1.3 Fatores de risco**

A maioria dos casos de PE ocorre em mulheres em sua primeira gravidez, nas quais a incidência da doença é superior a 7,5%. Os limites da faixa fértil, idade inferior a 18 ou superior a 35 anos na primeira gravidez, constituem fatores de risco independentes para a ocorrência de PE (BARTON *et al.*, 2008).

Mulheres com mais de uma gravidez, mas que trocaram de parceiro sexual também possuem risco elevado de desenvolvimento da doença (TUBBERGEN *et al.*, 1999; BARTON *et al.*, 2008). O aumento do intervalo entre as gestações também está associado ao aumento do risco. Gestações múltiplas e mulheres com histórico de PE em gravidez anterior possuem risco elevado de desenvolver a doença em gravidezes subsequentes, principalmente se essa tiver manifestado no início da gestação (DUCKITT *et al.*, 2005; BARTON *et al.*, 2008). A presença da PE em parentes de primeiro grau da gestante, bem como na história familiar paterna também contribuem para o aumento do risco de desenvolvimento de PE (ESPLIN *et al.*, 2001; CARR *et al.*, 2005).

Diversas condições clínicas estão associadas ao aumento do risco de PE, como hipertensão crônica, diabetes *mellitus*, obesidade, distúrbios renais, síndromes metabólicas, estados de hipercoagulabilidade, desordens vasculares e do tecido conectivo, como lúpus eritematoso sistêmico e síndrome dos anticorpos antifosfolípidos (DUCKITT *et al.*, 2005; SIBAI *et al.*, 2005; RAO *et al.*, 2006; BARTON *et al.*, 2008;)

As diferenças étnicas estão associadas a risco distinto. As mulheres afro-americanas possuem maior risco, seguido pelas mulheres de origem indiana e paquistanesa. A diferença de risco entre os grupos étnicos sugere a grande influência dos fatores genéticos na patogênese da PE (RAO *et al.*, 2006).

#### **2.1.4 Fisiopatologia e patogênese**

A fisiopatologia da PE ainda não está bem estabelecida. A doença é multifatorial e inclui o comprometimento da invasão citotrofoblástica das artérias uterinas, redução no suprimento de sangue à placenta, o que resulta em estresse oxidativo placentário, resposta inflamatória e disfunção endotelial (HEILMANN *et al.*, 2007).

A regulação da angiogênese no interior da placenta é crítico para o desenvolvimento de uma placenta saudável e conseqüentemente para o feto. Uma variedade de fatores pró-angiogênicos, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fator de crescimento placentário (PIGF), e fatores anti-angiogênicos, formas solúveis de tirosina quinase 1 (s-Flt-1) e endogлина solúvel, estão envolvidos no desenvolvimento da placenta e o equilíbrio entre esses fatores é essencial para uma placentação adequada (CETIN *et al.*, 2011). A PE está associada à redução da produção de fatores pró-angiogênicos. Akolekar *et al.* (2008) evidenciaram uma redução dos níveis de PIGF no plasma materno no primeiro trimestre da PE de início precoce. Assim como os níveis de PIGF apresentam-se reduzidos em pacientes que subsequentemente desenvolvem PE e os níveis de s-Flt-1 apresentam-se aumentados, o aumento da razão desses fatores foi identificado em mulheres sob risco de desenvolvimento de PE, principalmente nos casos de início precoce (VERLOHREN *et al.*, 2010).

Outro fator pró-angiogênico adicional, a endogлина solúvel, também foi observada em níveis aumentados na PE. Sendo assim, alterações nos níveis de s-Flt-1, PIGF e endogлина solúvel estão mais pronunciados na PE de início precoce em comparação à PE de início tardio (ROBINSON *et al.*, 2006; WIKSTRON *et al.*, 2007).

A superfície celular endotelial constitui uma área resistente efetiva contra a formação de coágulos nos vasos. Em condições fisiológicas e na gestação normal, as propriedades anticoagulantes do endotélio estão intactas. No entanto, na PE, a disfunção endotelial resulta em alteração local das propriedades anticoagulantes das células endoteliais (HEILMANN *et al.*, 2007).

Sabe-se que fatores circulantes, incluindo citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão, interleucinas e diferentes auto-anticorpos induzem a expressão de fator tecidual e ativação do sistema de coagulação (VENKATESHA *et al.*, 2006; HUI *et al.*, 2012). A hipercoagulabilidade resulta em deposição de fibrina

na microcirculação da placenta, comprometendo a sua perfusão e contribuindo para a prematuridade, o baixo peso fetal e a mortalidade neonatal (O'RIONDAN *et al.*, 2003). Evidências recentes sugerem que alterações na tensão local de oxigênio (IMPERATORE *et al.*, 2010; HEAZELL *et al.*, 2011) e na resposta imunológica (PENNINGTON *et al.*, 2012) constituem fatores fisiopatológicos importantes na PE.

O entendimento atual da PE propõe que a patogênese ocorra em duas fases. A primeira fase surge nas primeiras 12 semanas da gestação e caracteriza-se pela diferenciação defeituosa dos trofoblastos, invasão da decídua e remodelamento das artérias espiraladas, o que culmina com a entrada abrupta de sangue materno no espaço interviloso, causando lesão mecânica aos sinciciotrofoblastos e suprimento irregular de sangue na placenta (STAFF *et al.*, 2010; UZAN *et al.*, 2011). A segunda fase ocorre no segundo ou terceiro trimestres e resulta da hipoperfusão e isquemia da placenta (UZAN *et al.*, 2011).

A PE é caracterizada por isquemia placentária, estresse oxidativo excessivo e disfunção endotelial. Admite-se que a liberação de fatores pela placenta isquêmica no plasma materno, possui um papel central na disfunção endotelial associada à doença (CETIN *et al.*, 2011).

## **2.2 Hemostasia**

### **2.2.1 Sistema Hemostático**

O termo hemostasia refere-se ao processo fisiológico que capacita o organismo para formar um coágulo sanguíneo visando tamponar lesões vasculares, manter o sangue fluido e remover o coágulo após a reconstituição da parede vascular (O'RIONDAN *et al.*, 2003).

O êxito da hemostasia depende da ação coordenada entre os componentes pró-coagulantes e anticoagulantes do sangue. Dentre os pró-coagulantes destacam-se o endotélio vascular, as plaquetas e os fatores da coagulação e dentre os anticoagulantes, o endotélio vascular, os anticoagulantes naturais, o fator XII (F XII) e o sistema fibrinolítico (VERSTEEG *et al.*, 2013).

Quando a barreira de células endoteliais é rompida expondo o subendotélio, as plaquetas rapidamente detectam o local lesado, fazem contato, adesão, secreção do conteúdo dos grânulos e se agregam formando um tampão plaquetário no local

em que houve lesão da parede vascular (ANDREWS *et al.*, 2004). Simultaneamente, os fatores da coagulação são ativados em cascata, na qual a ativação de um determina a ativação do seguinte e, assim sucessivamente, até que o último fator que participa desse processo, o fibrinogênio é quebrado em monômeros de fibrina (ANDREWS *et al.*, 2004).

Na década de 60, dois grupos de pesquisadores, *Macfarlane* (MACFARLANE, 1964) e *Davie & Ratnoff* (DAVIE *et al.*, 1964) propuseram, de forma independente, o modelo de coagulação em cascata em duas vias distintas, a extrínseca e intrínseca, que culminariam em uma via comum e esse modelo foi aceito até recentemente.

A via intrínseca envolveria componentes do espaço intravascular e seria iniciada pelo contato de superfícies carregadas negativamente com o F XII, ativando-o. O F XIIa ativaria o fator XI (F XI) que ativaria o fator IX (F IX). O F IXa, na presença de fator VIII ativado (F VIIIa), ativaria o fator X (F Xa) que, na presença de fator V ativado (F Va), clivaria a protrombina (F II) em trombina (F IIa), a qual quebraria o fibrinogênio (F I) em fibrina (SMITH, 2009).

A via extrínseca envolveria componentes do sangue e também o fator tissular (FT) que, em condições fisiológicas, não está presente no espaço intravascular. Iniciaria com a ativação do fator VII (F VII) pelo FT e formação subsequente do complexo FT:F VIIa, que seria capaz de ativar o fator X (F X) na presença de F Va. A ativação dos fatores da coagulação a partir do F X constituiria a via comum da cascata (SMITH, 2009).

Apesar de amplamente aceito, este modelo da coagulação não explicava porque um indivíduo que tem a via extrínseca intacta não é capaz de compensar a deficiência de fatores envolvidos apenas na via intrínseca, como os fatores VIII ou IX, cujas deficiências resultam nas hemofilias A e B, respectivamente, que são acompanhadas por sangramentos importantes. De forma semelhante, os portadores de deficiência de F VII, que possuem a via intrínseca perfeitamente funcionando, também apresentam sangramento. Além disso, os portadores da deficiência de F XII não apresentam sangramentos e John Hageman, o primeiro portador diagnosticado com deficiência desse fator, morreu em consequência de um processo trombótico que resultou em embolia pulmonar. Tais questionamentos levaram à proposição de um novo modelo da cascata de coagulação, em 2006, por *Hoffman e Monroe* (HOFFMAN & MONROE, 2006).

O novo modelo, denominado modelo celular da coagulação, é baseado na interação de fatores da coagulação com superfícies celulares. Esse modelo requer a participação de dois tipos diferentes de células, células expressando FT e plaquetas, e sugere que a coagulação ocorra *in vivo* em fases sobrepostas distintas (SMITH, 2009). Esse novo modelo da coagulação inclui três fases, a iniciação, amplificação e propagação. Na fase de iniciação que ocorre após a lesão vascular, quando o sangue entra em contato com as células que expressam FT, o F VII rapidamente se liga a esse, tornando-se ativado. O complexo FT/F VIIa, ativa mais F VII, amplificando a atividade do complexo FT/F VIIa. Esse complexo ativa pequenas quantidades de fatores IX e X. Uma vez ativado, o F Xa, na presença do co-fator, F Va, forma o complexo protrombinase, o qual converte a protrombina (F II) em trombina (F IIa). A trombina, por sua vez, é suficiente para ativar plaquetas que extravasaram do espaço intravascular para o local lesado, bem como ativar os fatores V, VIII e XI. Se o F Xa dissociar-se das células que expressam o FT, os inibidores de protease presentes no plasma, como o fator inibidor da via do fator tissular (TFPI) ou a antitrombina (AT) rapidamente o inativam. Dessa forma, sua ação é limitada à superfície das células que expressam FT. O F IXa, por sua vez, não é inibido pelo TFPI ou AT, podendo dissociar-se da superfície celular e mover-se para a superfície de plaquetas vizinhas ou de outras células (HOFFMAN & MONROE, 2006).

Na fase de amplificação, os níveis dos fatores de ativação da coagulação são aumentados. A pequena quantidade de trombina acumulada ativa as plaquetas aderidas no local da lesão, mediante sua ligação a receptores plaquetários específicos. Ocorre liberação do conteúdo dos grânulos das plaquetas, que contêm agonistas que ativam mais plaquetas para o local da lesão vascular. Paralelamente, a trombina ativa o F V, amplificando a atividade do complexo protrombinase e o F VIII, dissociando-o do complexo F VIII/FvW, permitindo que o FvW medie a adesão e agregação plaquetária no local lesado. O F VIIIa atua como co-fator do F IXa. A trombina formada, ativa mais F XI (HOFFMAN & MONROE, 2006; VERSTEEG *et al.*, 2013).

Na fase de propagação, os fatores da coagulação se ligam fortemente às plaquetas ativadas e aumenta a formação de coágulos de fibrina. O F IXa, gerado pelo complexo FT/F VIIa, na fase de iniciação, pode se ligar ao F VIIIa, gerado na fase de amplificação na superfície plaquetária. O F IXa é também ativado pelo F XIa,

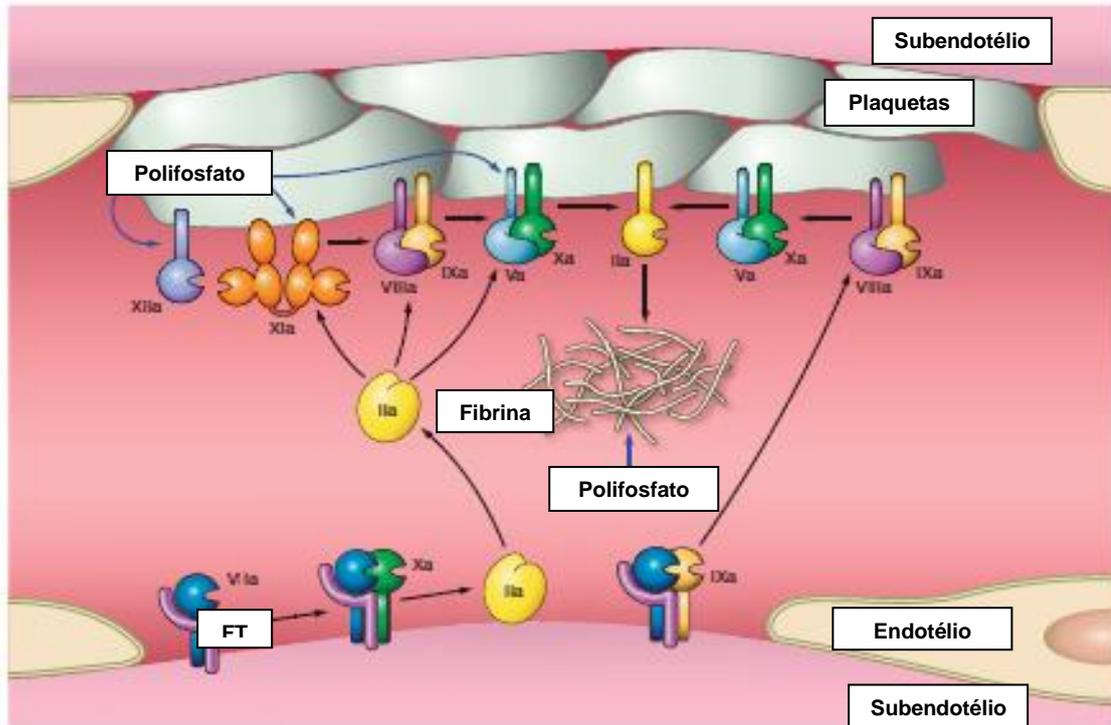
que foi gerado na fase de amplificação. O complexo tenase (F IXa/F VIIIa) ativa rapidamente o F X na membrana da plaqueta, esse se liga rapidamente ao F Va e cliva a protrombina (F II) em trombina (F IIa). A atividade protrombinase resulta em grande geração de trombina, que leva à quebra de grande quantidade de fibrinogênio em fibrina. A trombina ativa o F XIII, que modifica a fibrina polimerizada para formar ligações cruzadas entre as cadeias de fibrina, garantindo elasticidade e força ao coágulo formado (HOFFMAN & MONROE, 2006).

Este novo modelo da coagulação destaca o FT como o iniciador da coagulação, a importância das superfícies celulares e não inclui o FXII no processo hemostático *in vivo* (HOFFMAN & MONROE, 2006).

Recentemente, a atenção da comunidade científica se voltou para o FXII, uma vez que embora o modelo proposto por *Hoffman & Monroe* não o incluía, os testes da coagulação *in vitro*, o tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), que avaliam respectivamente as vias extrínseca e intrínseca, continuaram válidos e fornecendo informações importantes sobre a condição hemostática de um indivíduo.

A ativação do F XII é feita por polifosfatos derivados das plaquetas e dos neutrófilos e o entendimento atual da coagulação admite a importância desse fator *in vivo* na estabilização do coágulo de fibrina. Dessa forma, a deficiência de F XII está associada à formação de coágulos instáveis e embolização (VEERSTEG *et al.*, 2013). A **Figura 1** apresenta o modelo de coagulação atualmente aceito.

**Figura 1 - Novo modelo celular da cascata da coagulação.**



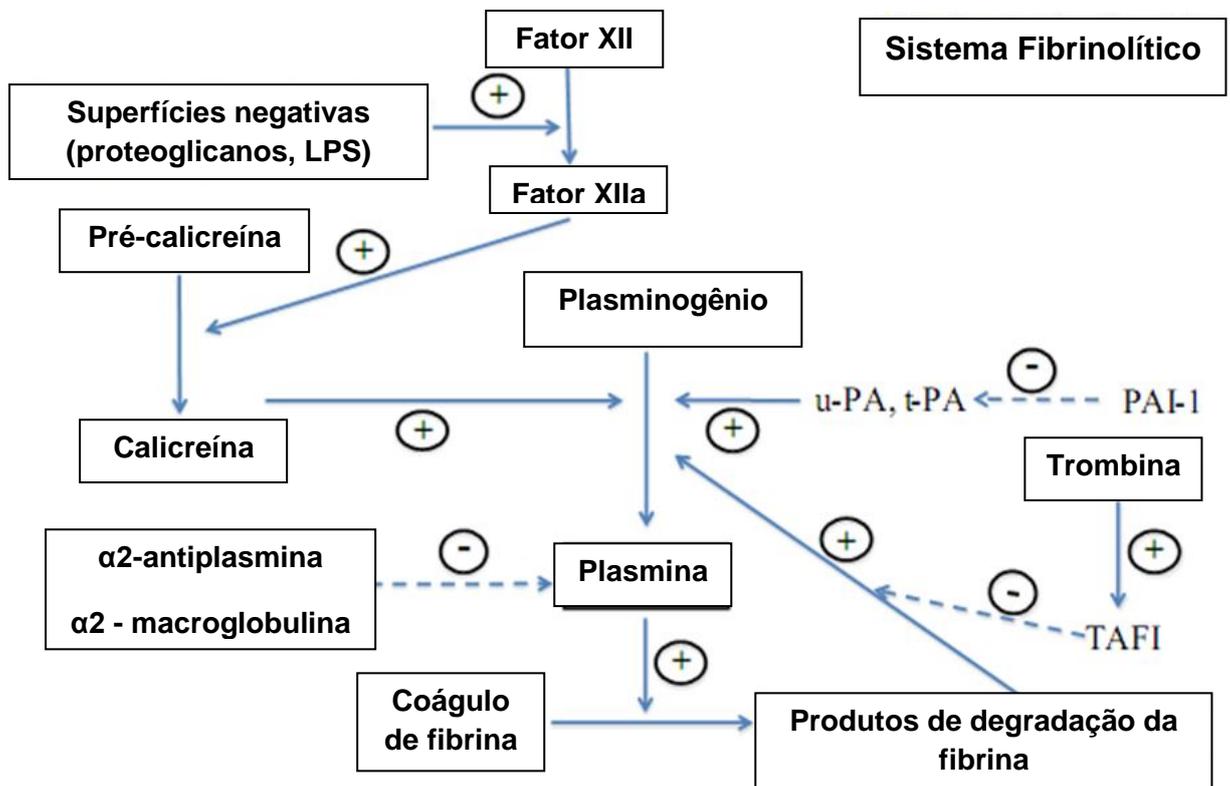
(VERSTEEG *et al.*, 2013). Adaptado.

### 2.2.2 Sistema Fibrinolítico

O sistema fibrinolítico atua na dissolução do coágulo de fibrina que se forma no local da lesão do endotélio vascular. A plasmina é a principal enzima responsável pela degradação enzimática do coágulo de fibrina em pequenos fragmentos, os produtos de degradação da fibrina (PDF). A plasmina resulta da ativação do plasminogênio que ocorre fisiologicamente por duas vias. A primeira envolve o ativador tecidual do plasminogênio (t-PA), que é secretado pelas células endoteliais, e o ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA), que além das células endoteliais, também é secretado em vários tecidos. A segunda envolve o F XII e uma serino protease, a calicreína, e o cininogênio de alto peso molecular. Quando o plasma entra em contato com superfícies negativas, como proteoglicanos, endotoxina de lipopolissacárides (LPS) ou diferentes tipos de cristais, o fator XII é ativado e ativa o plasminogênio em plasmina (SYROVETS *et al.*, 2012).

Os PDF podem ser detectados no plasma e seus níveis indicam a magnitude da fibrinólise, sendo que o menor fragmento da quebra da fibrina é o Dímero D (SCAZZIOTA *et al.*, 1996).

**Figura 2 – Apresentação esquemática do sistema fibrinolítico.**



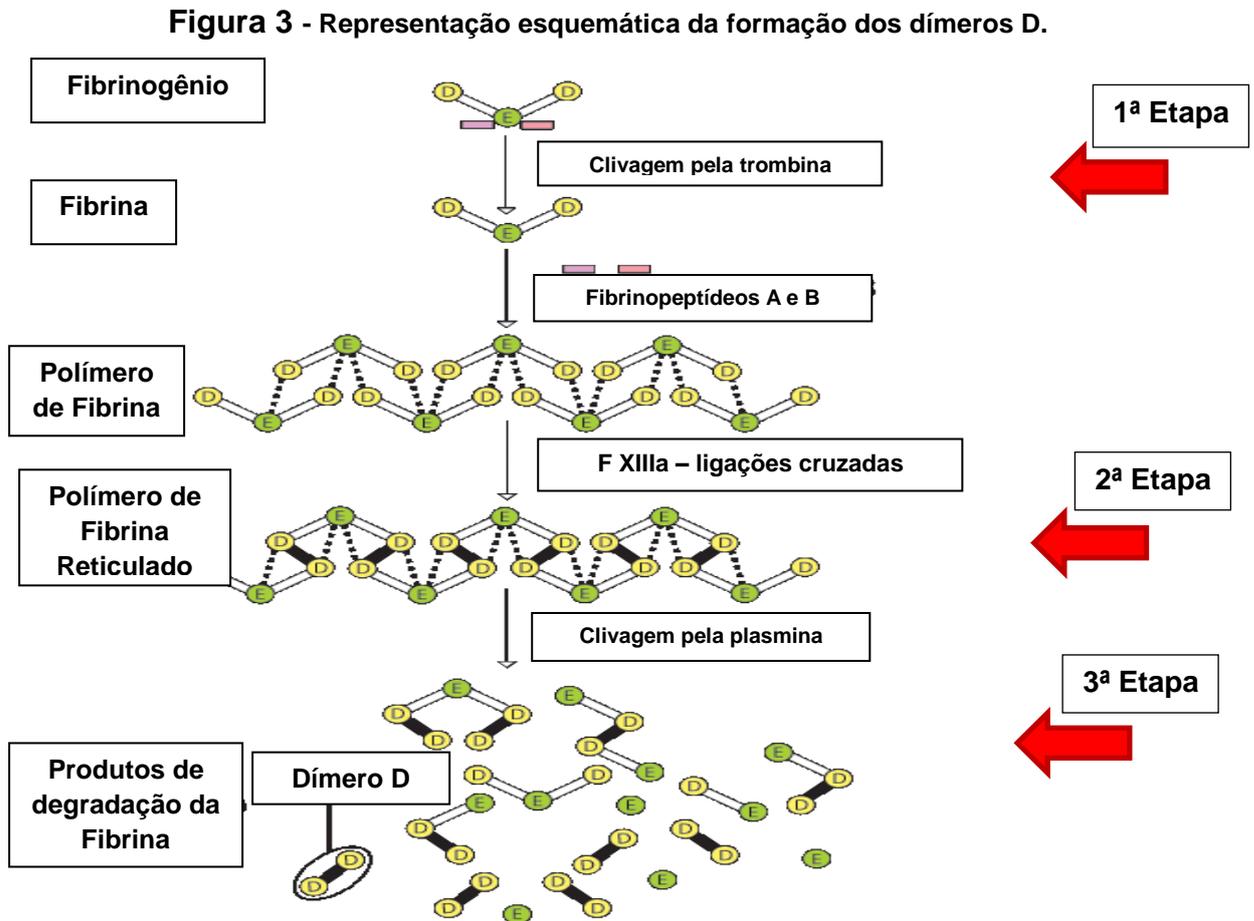
(PINHEIRO *et al.*, 2013). Adaptado.

A ação do sistema fibrinolítico é inibida pela  $\alpha$ 2-antiplasmina, PAI-1,  $\alpha$ 2-macroglobulina e inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI). Esses inibidores previnem a lise precipitada do coágulo, antes que tenha ocorrido reconstituição da parede vascular lesada (HOFFMAN & MONROE, 2006).

Desde a introdução dos testes para a avaliação dos níveis de D-Di, vários estudos têm mostrado o aumento desses fragmentos em pacientes com processos trombóticos, como CID, trombose venosa profunda (TVP), TEP, câncer, pós-operatório e trauma (GATTNEY *et al.*, 1988).

### 2.3 Dímero D

O D-Di é um indicador global de ativação da coagulação e da fibrinólise, constituindo um marcador sensível da formação e degradação da fibrina (BATES, 2012). A **Figura 3** esquematiza a formação dos dímeros D.



Fonte: <https://ahdc.vet.cornell.edu/Sects/Coag/test/Ddimer.cfm>. Adaptado.

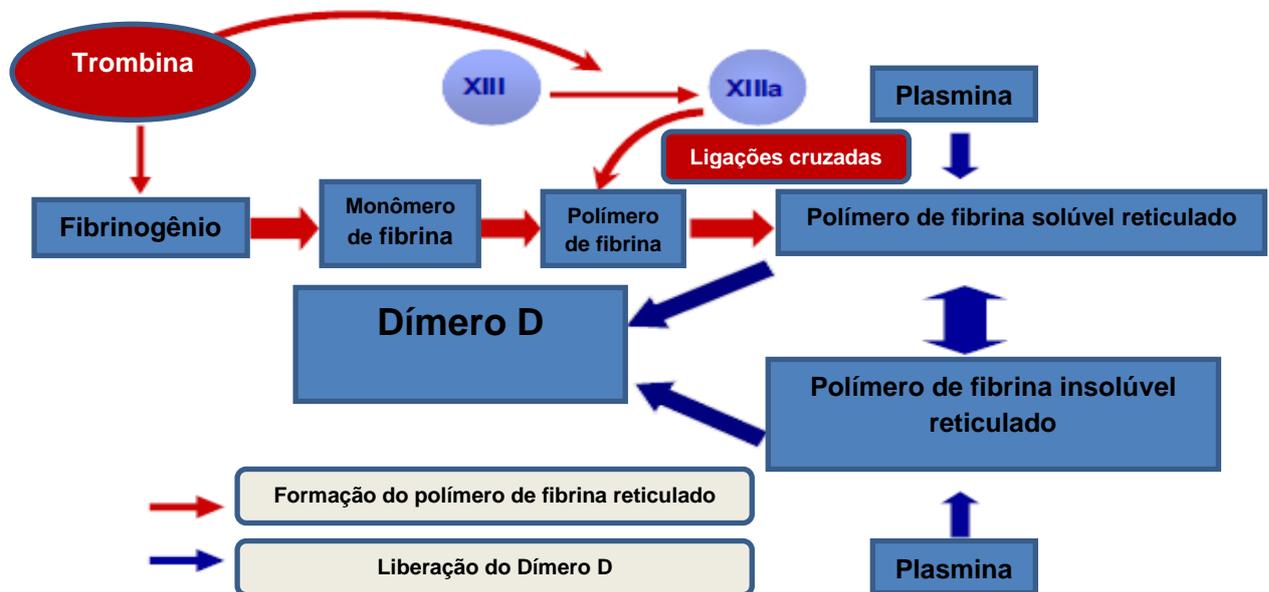
O D-Di possui meia-vida plasmática de oito horas, mantendo níveis fisiológicos basais. No entanto, seus níveis aumentam em algumas condições clínicas, principalmente em estados inflamatórios e condições pró-trombóticas, como o TEV, TEP, cirurgia (pós-operatório), hospitalização prolongada, trauma, queimaduras, infecções, gravidez e puerpério, CID, câncer, cardiopatia isquêmica, fibrilação atrial, desordens do tecido conectivo, doença inflamatória intestinal, insuficiência cardíaca congestiva, doenças renais ou hepáticas, terapia trombolítica, e idade avançada (BATES, 2012).

### 2.3.1 Determinação laboratorial de D-Di

Todos os testes laboratoriais disponíveis para a determinação dos níveis plasmáticos de D-Di utilizam anticorpos monoclonais que detectam os epítomos presentes apenas no domínio D dos fragmentos do polímero de fibrina reticulados e não detectam os produtos de degradação do fibrinogênio nem os PDF não-reticulados (ADAM *et al.*, 2009).

A **Figura 4** ilustra a quebra da fibrina e formação do D-Di.

**Figura 4 - Quebra da fibrina e formação do D-Di.**



(ADAM *et al.*, 2009). Adaptado.

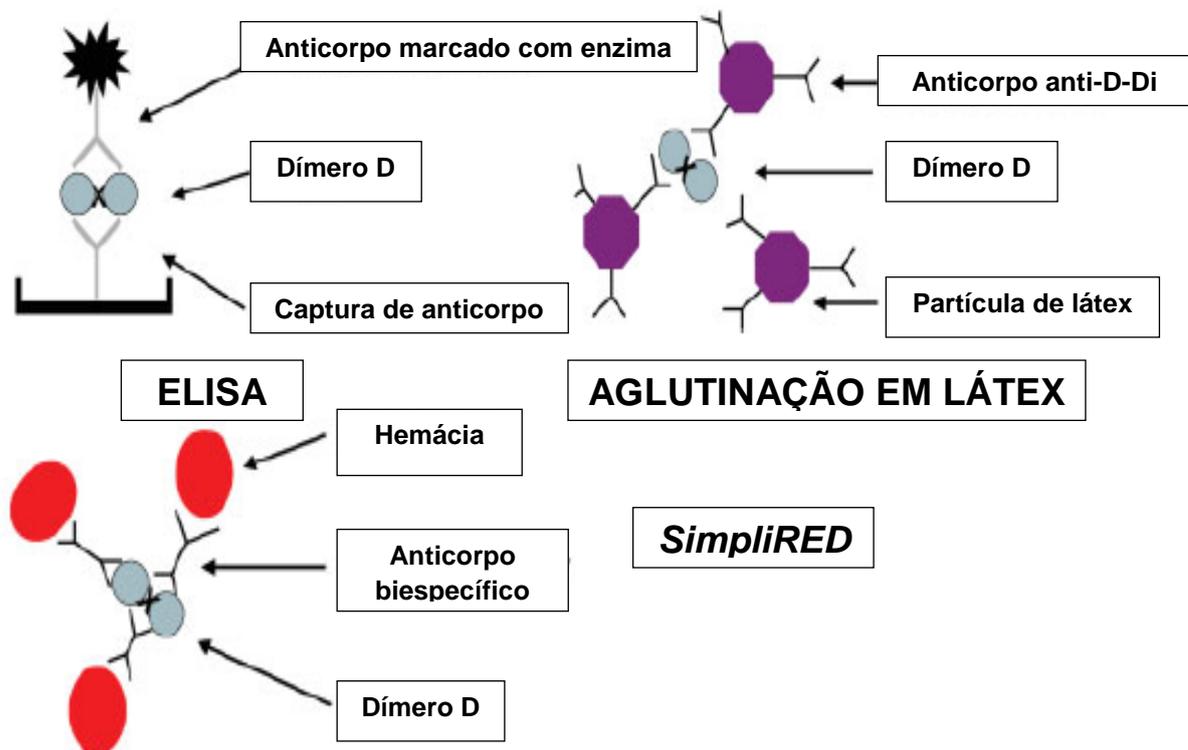
Três métodos estão atualmente disponíveis para a determinação laboratorial do D-Di:

1. Ensaio Imuno-enzimático (ELISA) e suas variações, ensaio imuno-enzimático fluorescente (ELFA) e imunofluorescência. Este método baseia-se na captura de anticorpos e identificação do D-Di;
2. Ensaio de aglutinação com sangue total (SimpliRED), o qual utiliza um anticorpo conjugado biespecífico para o antígeno D-Di e para o antígeno da hemácia e utiliza sangue total;

3. Ensaio de aglutinação em látex, que também utiliza anticorpos biespecíficos com especificidade para a partícula de látex e para o antígeno D-Di. Os testes antigos de aglutinação em látex eram qualitativos ou semi-quantitativos e os atuais, automatizados, são quantitativos (BATES, 2012).

O princípio dos três métodos disponíveis para determinação plasmática do D-Di está esquematizado na **Figura 5**.

**Figura 5 - Representação esquemática do princípio dos três métodos disponíveis para determinação plasmática do D-Di**



(BATES, 2012). Adaptado.

O método ELISA e as variações ELFA e imunoturbidimetria possuem maior sensibilidade (95%) e menor especificidade (50%) em comparação ao método da aglutinação com sangue total (85% e 70%, respectivamente) (ADAM *et al.*, 2009). Os clínicos devem estar atentos para solicitar o teste mais adequado ao contexto clínico avaliado. Dessa forma, para a exclusão de TEV, o que é recomendado é o ELISA e aglutinação em látex (imunoturbidimetria), que foram aprovadas pela *US Food and Drug Administration* (ADAM *et al.*, 2009)

É importante destacar que a comparação de resultados de D-Di obtidos em diferentes estudos possui uma série de limitações, como a utilização de diferentes anticorpos monoclonais com especificidades variadas para padronização do método, diferentes formatos de ensaios clínicos, diferentes equipamentos e instrumentos, diferentes padrões de calibração, variações nos valores discriminatórios (*cut-off*) utilizados para distinguir resultados positivos de negativos, além de diferenças nas populações de pacientes utilizadas nos estudos (BATES, 2012).

### **2.3.2 D-Di e exclusão de tromboembolismo venoso**

A principal aplicação clínica do D-Di está na exclusão diagnóstica de TEV e TEP, quando os níveis desse marcador estão normais (<500ng/mL), o que lhe confere alto valor preditivo negativo (MORESCO *et al.*, 2005).

A determinação plasmática de D-Di tem importância clínica para monitorar pacientes durante e após o tratamento com anticoagulante oral para TEV recorrente, considerando que seus níveis diminuem durante o tratamento (KEVORKIAN *et al.*, 1998).

Dois estudos clássicos, o *Prolong Study I e II*, demonstraram que os pacientes com D-Di elevado (>500ng/mL) que continuaram o uso de anticoagulante oral, apresentaram uma incidência significativamente baixa de TEV de recorrência, em comparação àqueles que interromperam o uso de anticoagulante oral. Além disso, níveis elevados de D-Di foram associados à maior risco de TEV recorrente e o aumento persistente de D-Di após o terceiro mês de uso do anticoagulante oral, indicou um aumento de sete vezes no risco de recorrência de TEV (PALARETI *et al.*, 2006; COSMI *et al.*, 2010).

## **2.4 PAI-1**

O PAI-1 é uma glicoproteína de cadeia única (52.000kDa) composta por 379 resíduos de aminoácidos (NY *et al.*, 1986; GINSBURG *et al.*, 1986). O PAI-1 é secretado principalmente pelas células endoteliais, estimuladas por fatores como a trombina, endotoxina, dexametasona, interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e fator de crescimento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (KRUIHOF *et al.*, 1988;

ESTELLES *et al.*, 1998). Além das células endoteliais, o tecido adiposo constitui uma fonte importante de PAI-1 (SAMAD *et al.*, 1996; LUNDGREN *et al.*, 1996).

O PAI-1 é o principal inibidor da ativação do plasminogênio, pois inibe a ação do t-PA e do u-PA, contribuindo para prolongar a permanência do coágulo de fibrina no vaso sanguíneo (CESARMAN-MAUS *et al.*, 2005).

O inibidor do ativador do plasminogênio tipo 2 (PAI-2) origina-se na placenta e é detectado no plasma materno desde o primeiro trimestre, aumentando substancialmente ao longo da gravidez (JEREMIAH *et al.*, 2012).

As primeiras metodologias laboratoriais propostas para a determinação dos níveis plasmáticos do PAI-1 baseavam-se em ensaios funcionais. Tais métodos consistiam na neutralização da ação do t-PA adicionado às amostras de plasma, por meio da medida da atividade residual do t-PA, em placas de fibrina. Métodos espectrofotométricos também foram utilizados para avaliar a neutralização da ação do t-PA. No entanto, esses métodos apresentam uma série de desvantagens, como a interferência de outros inibidores de protease, alta variabilidade inter-ensaios e a não distinção entre os diferentes tipos do PAI (KRUITHOF *et al.*, 1984; VERHEIJEN *et al.*, 1984; THORSEN *et al.*, 1984).

Posteriormente, a metodologia de determinação laboratorial do PAI-1 passou a basear-se na utilização de imuno-ensaios, como o ELISA e o ensaio imunoradiométrico (IRMA) (SCHLEEF *et al.*, 1985; URDÉN *et al.*, 1987). Estes testes apresentam como desvantagem a necessidade de utilizar anticorpos monoclonais, além de problemas relacionados à calibração, reprodutibilidade e disponibilidade dos reagentes. Os testes por ELISA são mais simples, possuem maior sensibilidade e permitem uma menor variabilidade inter-laboratorial, quando comparados aos testes mais antigos (DECLERCK *et al.*, 1988).

Os níveis plasmáticos de PAI-1 encontram-se elevados em diversas condições associadas a risco de eventos cardiovasculares isquêmicos, de TEV, em indivíduos obesos e no pós-operatório (JUHAN-VAGUE *et al.*, 1984, VAUGHAN, 2005).

## 2.5 D-Di na gestação normal

Está bem estabelecido que um aumento nos níveis de D-Di pode sinalizar dois processos fisiológicos, a formação exagerada de coágulos de fibrina ou a quebra excessiva do coágulo (JEREMIAH *et al.*, 2012).

A gestação normal está associada ao aumento plasmático do D-Di. Paradoxalmente, os níveis de PAI-1 aumentam durante os últimos estágios da gravidez e o PAI-2 aumenta substancialmente ao longo da gravidez, o que poderia sugerir o comprometimento do sistema fibrinolítico nessa condição e, conseqüentemente, reduzir os níveis de D-Di. No entanto, os níveis de plasminogênio aumentam e os de  $\alpha 2$ -antiplasmina diminuem na gravidez (JEREMIAH *et al.*, 2012), o que explicaria o aumento progressivo nos níveis de D-Di em gestações normais (FRANCALANCI *et al.*, 1995; GIAVARINA *et al.*, 2001; KLINE *et al.*, 2005; HALILOGLU *et al.*, 2010; HANSEN *et al.*, 2011; HUI *et al.*, 2012).

A gravidez normal está associada a um estado de hipercoagulabilidade, que visa preparar o organismo materno para o grande desafio hemostático representado pela expulsão da placenta após o parto (GILABERT *et al.*, 1995). Dessa forma, os níveis plasmáticos de D-Di são fisiologicamente mais elevados nas gestantes, comparando-se com mulheres não gestantes, o que sugere a ativação do sistema fibrinolítico, provavelmente para compensar o aumento dos fatores de coagulação e prevenir a ocorrência de TEV na gravidez normal (JEREMIAH *et al.*, 2012).

O estabelecimento do *cut-off* para os níveis de D-Di, em cada período gestacional assume grande importância para distinguir uma exacerbação da coagulação na gestação e, dessa forma, contribuir para a adoção de medidas terapêuticas que visem a prevenção de eventos trombóticos nessa condição clínica.

Um estudo pioneiro, do tipo coorte, foi realizado na Austrália, de 2007 a 2009, para investigar a existência de diferenças significativas entre dois métodos de determinação de D-Di (*D-Dimer PLUS* e *INNOVANCE D-Dimer*), em cada trimestre da gestação e estabelecer a faixa de variação normal desse parâmetro ao longo da gestação (Khalafallah *et al.*, 2012). Esses pesquisadores objetivavam, também, avançar no entendimento da elevação de D-Di na gestação, visando detectar precocemente as complicações gestacionais, possibilitando a rápida intervenção e a prevenção das conseqüências indesejáveis. Nesse estudo foram incluídas 632 gestantes (idade=18-42anos, peso=46-137kg) e a determinação foi feita a cada

trimestre de gestação. Nos casos em que foi detectado um aumento, superior a dois desvios-padrão (DP), dos níveis plasmáticos de D-Di, as gestantes foram monitoradas mensalmente, por mais de três meses, para detectar possíveis complicações associadas à gravidez. A evidência de alguma doença ou condição clínica durante a gestação foi diagnosticada e acompanhada, sendo as principais, desordens hematológicas (n=33), como anemia, gamopatia monoclonal, contagem anormal de linfócitos T e B, malformação e mal posição fetal (n=27), gravidez múltipla (n=6), hipertensão gestacional e/ou proteinúria (n=23) e diabetes (n=12).

Os resultados demonstraram que os níveis de D-Di, avaliados pelos dois métodos, aumentaram progressivamente ao longo da gestação. No entanto, houve diferença entre os resultados fornecidos pelos dois métodos. Durante o 1º trimestre, a variabilidade dos resultados obtidos pelo *D-Dimer PLUS* foi maior que do *INNOVANCE*, como revelaram os respectivos DP, de 0,88 e 0,72. O aumento da média dos resultados foi maior para o *INNOVANCE* que para *D-Dimer PLUS*, como demonstrado pela relação dos níveis de D-Di no 3º e 1º trimestres, de 3,68 e 1,96, respectivamente. Os pesquisadores concluíram que o teste *INNOVANCE* é mais sensível que o *D-Dimer PLUS* para detectar o aumento progressivo de D-Di ao longo da gestação. Não foi possível estabelecer uma associação consistente entre a elevação dos níveis de D-Di e nenhuma doença ou condição clínica diagnosticada durante a gestação.

*Kawaguchi et al.* realizaram um estudo retrospectivo no Japão, de 2007 a 2012 envolvendo 1185 grávidas (idade=31,9±5,3 anos), sendo 118 gestantes com 4-13 semanas de gestação, 372 com 14-27, 681 com 28-35 e 781 com 36-42. Dezesete gestantes foram investigadas para o desenvolvimento de TEV, devido ao aparecimento de sintomas clínicos, sendo que três tiveram diagnóstico confirmado, dois casos de tromboembolismo pulmonar e um caso de trombose venosa profunda. Essas três gestantes foram excluídas das análises estatísticas. Os níveis de D-Di foram determinados por meio do ensaio de aglutinação em látex (*Mitsubishi Kagaku Iatron Inc.*). A média e os valores 95 percentil do D-Di ( $\mu\text{g/mL}$ ) nas 1182 grávidas sem TEV foram: 0,54 e 2,41 na 4ª a 13ª semana gestacional, aumentou gradualmente para 1,22 e 5,03 na 14ª a 27ª, 1,81 e 6,18 na 28ª a 35ª e 2,13 e 5,85 na 36ª a 42ª, respectivamente. Apenas 17 e 6 mulheres exibiram valores de D-Di >10 e >14 $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, enquanto as três mulheres com TEV clínico exibiram D-Di >14 $\mu\text{g/mL}$ . Os valores médios do D-Di em gestantes no 3º trimestre

para os diferentes testes foram 1,48 $\mu$ g/mL (*Vidas D-dimer – bioMérieux*), 1,25 $\mu$ g/mL (*Asserachrome D-dimer – Stago*), 0,42 $\mu$ g/mL (*IL-Test – Lexington*), 0,99 $\mu$ g/mL (*Stalialia Test – Stago*) e 1,56 $\mu$ g/mL (*Innovance D-dimer – Siemens*).

*Wang et al.*, realizaram um estudo na China, de 2009 a 2011 envolvendo 2465 mulheres (idade=18-41 anos), sendo 80 mulheres não grávidas (grupo controle), 1343 gestantes, que foi dividido em subgrupos (1º trimestre, n=203; 2º trimestre, n=401 e 3º trimestre, n=739) e 1042 eram mulheres no pós-parto, que foi dividido em subgrupos (506 partos cesárea, dos quais 302 foram eletivos e 204 emergências, e 536 partos normais, dos quais 435 espontâneos e 101 com intervenções instrumentais). Também foi feita a determinação de D-Di em mulheres com suspeita clínica de TEV/CID. Diversos critérios de exclusão foram estabelecidos para cada grupo, no intuito de diminuir as interferências dos fatores que influenciam na dosagem dos níveis de D-Di. A determinação de D-Di foi feita pelo método de imunoturbidimetria - aglutinação em látex, no *STA-R evolution coagulation analyser (Diagnostica Stago)*. No grupo controle, o valor 95 percentil de D-Di foi 0,56mg/L. No grupo das gestantes, observou-se que os níveis de D-Di foram aumentando gradualmente ao longo da gestação e apresentaram alta correlação positiva e significativa com a idade gestacional ( $r_s=0,70$  e  $p<0,001$ ). Durante o 1º trimestre gestacional, 14,78% das grávidas tinham D-Di  $>0,5$ mg/L, que é o ponto de corte para o diagnóstico convencional de TEV em mulheres não grávidas, de acordo com as recomendações do fabricante do reagente. Nos 2º e 3º trimestres gestacionais, esses valores foram de 70,82% e 95,94%, respectivamente. Houve diferença significativa nos níveis de D-Di, entre os períodos de gravidez ( $p<0,05$ ). Em relação aos níveis de D-Di avaliados no pós-parto e de acordo com o tipo de parto realizado, esses continuaram a aumentar durante o parto com um pico no 1º dia pós-parto. Em seguida começaram a diminuir, atingindo os níveis de mulheres não grávidas no 42º dia pós-parto. Nas gestantes que realizaram cesáreas, os níveis de D-Di foram significativamente maiores do que naquelas que tiveram partos normais e na maioria estavam acima de 0,5mg/L nos 1º e 3º dias pós-parto. Em seguida, diminuíram até o 42º dia pós-parto. Nas gestantes com complicações gestacionais ou com suspeita clínica de TEV, dois casos de TEV foram confirmados, houve significativo aumento e manutenção de níveis elevados de D-Di, após a realização de cesárea. O aumento do D-Di indicou o aparecimento de TEV antes da visualização do processo

trombótico por ultrassom. Os níveis de D-Di, nas gestantes com TEV foram muito superiores aos das mulheres saudáveis no pós-parto ( $p < 0,05$ ).

*Jeremiah et al.* realizaram um estudo transversal observacional, em 2012, na Nigéria, envolvendo 180 mulheres, sendo 120 grávidas (idade=  $28,4 \pm 4,2$  anos) e 60 não grávidas (grupo controle), (idade=  $30,2 \pm 9,5$  anos). As mulheres com história familiar de doenças tromboembólicas, HIV ou PE foram excluídas do estudo. A determinação de D-Di foi feita por ELISA (*Technozym D-dimer*). O valor médio do D-Di foi maior para as gestantes (153,1ng/mL) em relação às não gestantes (118,5ng/mL), ( $p = 0,021$ ). Foram obtidos valores normais de D-Di (0-200ng/mL) em 63,3% das grávidas e 73,3% dos controles, valores elevados de D-Di (201-499ng/mL) em 26,7% das grávidas e valor de D-Di associado à risco de evento trombótico ( $\geq 500$ ng/mL) em 10% das grávidas. Esses pesquisadores obtiveram um aumento progressivo do D-Di, até 600ng/mL, durante o 2º e 3º trimestres gestacionais.

*Réger et al.*, em 2012, avaliaram 83 gestantes provenientes da Hungria (idade=  $28,85 \pm 4,3$  anos). Amostras de sangue foram coletadas nas 16ª, 26ª e 36ª semanas gestacionais e 55 gestantes apresentavam gravidez normal, sem sinais e sintomas patológicos, enquanto 28 apresentavam gravidez anormal. A determinação de D-Di foi feita utilizando o *ACL 9000 optical coagulation instrument* (imunoturbidimetria). Esses pesquisadores obtiveram um aumento gradual de D-Di da 16ª até as 26ª e 36ª semanas gestacionais, com diferenças estatisticamente significantes entre as semanas ( $p < 0,001$ ). Enquanto a média do nível de D-Di na 16ª semana ( $< 250$ ng/mL) continuou abaixo do *cut-off* convencional para mulheres normais não grávidas, as médias na 26ª ( $< 309$ ng/mL) e 36ª semanas ( $< 541$ ng/mL) excederam esse limite. Os níveis de D-Di de 42% de todas as gestantes examinadas estavam, durante toda a gravidez, acima do valor de *cut-off* de referência (250ng/mL) das mulheres não grávidas, e na 36ª semana gestacional elevou para 98%. O aumento da média dos valores de D-Di entre as 16ª e 26ª semanas foi de 133%, enquanto entre as 26ª e 36ª semanas foi de 156%.

*Joly et al.*, realizaram um estudo na França em 2013, incluindo 106 grávidas, sendo 36 no 1º trimestre, 42 no 2º trimestre e 23 no 3º trimestre (idade média=  $30 \pm 5$  anos). Os critérios de inclusão no estudo foram pressão sanguínea normal, massa corporal pré-gravidez normal, ausência de diabetes gestacional, tratamento com antitrombóticos, ausência de história prévia de TEV ou gravidez patológica. A

determinação de D-Di foi feita por ELISA. Foi obtido um aumento significativo dos níveis de D-Di ao longo da gravidez, a cada mês e a cada trimestre, sendo no 1º trimestre=384±218ng/mL, no 2º trimestre=764±397 ng/mL e no 3º trimestre=1074±258 ng/mL.

*Murphy et al.*, realizaram um estudo transversal em 2014 na Irlanda, incluindo 760 grávidas (idade média=31 anos). Foram excluídas as gestantes com histórico prévio de TEV, tratamento com aspirina ou heparina, PE, disfunção útero-placentária, anormalidades congênitas e partos prematuros. Foram estabelecidos cinco grupos gestacionais: <12 semanas (n=164), 19-21 (n=167), 28-36 (n=137), 38-40 (n=138) e 48 horas pós-parto (n=154). A determinação de D-Di foi feita por aglutinação em látex (imunoturbidimetria) pelo ensaio *Bio-Pool Auto-Dimer*. Os resultados obtidos evidenciaram um aumento linear do D-Di ao longo da gestação seguida de uma queda no período pós-parto. Níveis de D-Di normais, levando em consideração o *cut-off* recomendado (224ng/mL) para a população local não grávida foram obtidos em 133 grávidas (81%) com menos de 12 semanas de gestação, 53 (32%) com 19 a 21 semanas, 8 (6%) com 28 a 36 semanas, em nenhuma com 38 a 40 semanas e 12 (8%) no 2º dia pós-parto.

A maior limitação da maioria dos estudos citados foi o desenho transversal, onde foram comparadas diferentes gestantes com a mesma idade gestacional. Desenhos longitudinais, nos quais as mesmas gestantes são acompanhadas ao longo da gestação, e os níveis de D-Di determinados nos períodos gestacionais diferentes, certamente são mais apropriados.

Considerando o aumento dos níveis de D-Di na gestação e a grande diversidade dos valores obtidos nos diferentes estudos, é fundamental estabelecer a faixa de referência de D-Di nos três trimestres da gestação, para auxiliar o acompanhamento das gestantes e prevenir complicações durante a gravidez. No entanto, a diversidade de métodos utilizados nos estudos e a condição clínica das gestantes avaliadas inviabilizam a definição da faixa de referência de D-Di na gestação.

Uma busca na literatura revelou apenas dois estudos, nos quais a determinação de D-Di foi feita nas mesmas gestantes ao longo da gestação normal, são eles: *Khalafallah et al.* (2012) e *Réger et al.* (2012) e conforme explicitado acima, ambos evidenciaram um aumento gradual nos níveis plasmáticos de D-Di ao longo da gestação, especialmente no último trimestre.

## 2.6 PAI-1 na gestação normal

Os primeiros estudos que avaliaram o sistema fibrinolítico, pelo método da lise do coágulo de fibrina, na gestação normal indicavam uma diminuição gradual da ação desse sistema e os menores valores dos marcadores de fibrinólise foram encontrados no terceiro trimestre da gestação (BIEZENSKI *et al.*, 1958; SHAPER *et al.*, 1965; e MENON *et al.*, 1970).

Outros estudos da fibrinólise na gravidez normal evidenciam aumento dos níveis de t-PA e u-PA, o que sugere ativação do sistema fibrinolítico (KOH *et al.*, 1992; HALIIGAN *et al.*, 1994; BELO *et al.*, 2002). Um aumento dos níveis plasmáticos de PAI-1 e de PAI-2 pela placenta tem sido encontrado e é interpretado como uma forma de compensar o aumento dos ativadores do plasminogênio nessa condição (DECLERCK *et al.*, 1988; ESTELLES *et al.*, 1989; CADROY *et al.*, 1993; HALIIGAN *et al.*, 1994).

O t-PA é produzido pelas células endoteliais, secretado localmente em resposta a lesões dessas células. O t-PA é um ativador potente do plasminogênio, etapa crucial para a produção de plasmina, que é a enzima capaz de degradar o coágulo de fibrina (NORRIS, 2003).

*Estelles et al.* (1989) avaliaram a atividade do PAI-1, pelo teste IRMA, em 43 gestantes normotensas (n=9) no 1º trimestre, (n=10) no 2º trimestre e (n=24) no 3º trimestre. Esses pesquisadores encontraram um aumento do 1º para o 3º trimestre (de 0,64 para 2,57U/mL). Esse aumento foi confirmado pelo método ELISA (de 11,74 para 34,86ng/mL).

*Choi et al.* (2002) realizaram um estudo para investigar a relação entre a coagulação e o sistema fibrinolítico em 436 mulheres, incluindo 295 gestantes normotensas, sendo no 1º trimestre (n=107), no 2º (n=65) e no 3º (n=123). Foram também incluídas 109 mulheres no pós-parto, sendo de 1 à 4 semanas pós-parto (n=71) e de 5 à 8 semanas (n=38) e 32 não gestantes. Os níveis plasmáticos de PAI-1 e t-PA, foram determinados por ELISA (*Diagnostica Stago, France*). Foi observado um aumento gradual dos níveis de PAI-1 a partir do 2º trimestre gestacional ( $45,2 \pm 9,7$ ng/mL), atingindo concentração máxima no 3º trimestre ( $75,9 \pm 12,4$ ng/mL). Os níveis plasmáticos de t-PA no 3º trimestre ( $6,9 \pm 1,9$ ng/mL) foram 1,8 vezes maiores do que no 1º trimestre ( $4,4 \pm 1,69$ ng/mL). Apesar dos níveis elevados de PAI-1, um aumento nos níveis de PDF e D-Di também foram obtidos

durante a gravidez, sugerindo que a ativação do sistema fibrinolítico ocorre em resposta ao estado de hipercoagulabilidade fisiológico da gestação. Os níveis plasmáticos de PAI-1 correlacionam-se significativamente com os níveis de D-Di ( $r=0,51$ ,  $p<0,01$ ) e t-PA ( $r=0,47$ ,  $p<0,01$ ) durante a gravidez.

Um estudo longitudinal, realizado de 2004 a 2007, envolvendo 20 mulheres antes da gestação e no 1º e 3º trimestres gestacionais, revelou um aumento dos níveis de t-PA e de PAI-1 no 3º trimestre da gravidez ( $5,0\pm 0,22\text{ng/mL}$  e  $66,4\pm 4,9\text{ng/mL}$ , respectivamente) em comparação ao período pré-gravidez ( $4,2\pm 0,4\text{ng/mL}$  e  $17,3\pm 5,7\text{ng/mL}$ , respectivamente) e ao 1º trimestre ( $3,6\pm 0,2\text{ng/mL}$  e  $17,7\pm 1,9\text{ng/mL}$ , respectivamente) ( $p<0,001$ ) (HALE *et al.*, 2012).

## 2.7 D-Di na PE

Diversos estudos têm demonstrado um aumento dos níveis plasmáticos de D-Di em gestantes pré-eclâmpticas em comparação às normotensas.

*Paternoster et al.* (1996) realizaram um estudo na Itália, envolvendo 18 gestantes normotensas, 19 pré-eclâmpticas e 13 com PE superposta à hipertensão crônica. Os critérios de exclusão das gestantes selecionadas foram distúrbios cardiovasculares e renais, gestações complicadas por doenças infecciosas e sangramento vaginal antes do parto. Os níveis de D-Di foram determinados por ELISA no terceiro trimestre gestacional. As médias dos níveis plasmáticos obtidas foram 197 (134-260mg/L) nas normotensas, 307(78-1241mg/L) nas pré-eclâmpticas e 137 (70-307mg/L) nas gestantes com PE superposta à hipertensão crônica. No entanto, não foi revelada diferença estatisticamente significativa entre os três grupos avaliados.

*Higgins et al.* (1998) realizaram um estudo na Irlanda, envolvendo dois grupos de gestantes. O primeiro consistia de 30 gestantes normotensas e 22 pré-eclâmpticas acompanhadas longitudinalmente ao longo da gravidez e no pós-parto. O segundo grupo consistia de 20 gestantes com PE e 19 gestantes normotensas. Os níveis de D-Di foram avaliados por ELISA. Das gestantes do segundo grupo, no momento do parto, antes da expulsão da placenta, foi coletada também uma amostra de sangue de uma veia uterina que drena o local da inserção placentária. Os resultados revelaram que os níveis de D-Di na circulação periférica foram aumentando significativamente ao longo da gravidez entre as mulheres normotensas

e com PE e não foram obtidas diferenças significativas comparando os dois grupos nos períodos gestacionais 18-24 semanas (363ng/mL e 370ng/mL, respectivamente), 28-32 semanas (460ng/mL e 400ng/mL, respectivamente) e  $\geq 33$  semanas (688ng/mL e 728ng/mL, respectivamente). No entanto, os níveis de D-Di na circulação útero-placentária das gestantes pré-eclâmpticas (825ng/mL) foram elevados em relação aos níveis circulantes periféricos (600ng/mL) ( $p < 0,01$ ) e os níveis de D-Di na circulação útero-placentária das gestantes pré-eclâmpticas (825ng/mL) foram maiores em relação à circulação útero-placentária das normotensas (600ng/mL) ( $p < 0,01$ ).

*Royle et al.* (1998) realizaram um estudo na Nova Zelândia, avaliando os níveis de D-Di por meio de duas metodologias, ELISA e aglutinação em látex de 44 gestantes diagnosticadas com hipertensão gestacional e proteinúria após a 32ª semana gestacional e 55 gestantes normotensas, antes da 24ª semana de gestação. A média dos níveis de D-Di, determinado por ELISA, nas gestantes normotensas no 2º trimestre de gestação foi de 45 (26-54ng/mL) e no 3º trimestre 85 (42-135ng/mL). Pelo método de aglutinação em látex, a média dos níveis de D-Di nos dois trimestres foi inferior a 250ng/mL. No grupo de gestantes com PE a média dos níveis de D-Di, determinado por ELISA, no 3º trimestre de gestação foi 148 (87-249ng/mL) e pelo método de aglutinação em látex foi inferior a 250ng/mL. Dessa forma, pelo método de aglutinação em látex não houve diferença significativa entre os níveis de D-Di nos dois grupos, no 3º trimestre de gestação. No entanto, pelo método ELISA, a média nas gestantes com PE foi superior àquela obtida para as gestantes normotensas ( $p = 0,03$ ).

*Xiong et al.* (2011) realizaram um estudo na China de 2005 a 2006, envolvendo 46 gestantes com PE e 40 gestantes normotensas com gestações únicas, no terceiro trimestre gestacional, no dia do parto (cesárea), no 1º e 5º dias após o parto e em amostras de sangue do cordão umbilical. Os critérios de exclusão utilizados foram diabetes *mellitus*, hipertensão crônica, doença renal e hepática e distúrbios cardiovasculares. Houve uma tendência à diminuição dos níveis plasmáticos de D-Di das gestantes com PE em comparação às normotensas antes e após o parto, embora não tenha alcançado significância. Esses pesquisadores também avaliaram os níveis de D-Di no plasma fetal dos dois grupos, e não encontraram diferenças. Comparando-se os níveis de D-Di dosados no plasma fetal

com os do plasma materno nos dois grupos, observou-se uma diminuição nos níveis de D-Di no plasma fetal.

*Belo et al. (2002)* realizaram um estudo em Portugal, avaliando os níveis de D-Di por ELISA em 56 gestantes normotensas e 37 gestantes com PE no 3º trimestre de gestação. A média dos níveis de D-Di obtidos foi 484 (290-741ng/mL) para as pré-eclâmplicas, estatisticamente superior àquela obtida para as gestantes normotensas, 348 (245-502ng/mL).

*Hale et al. (2012)* realizaram um estudo nos Estados Unidos, de 2004 a 2007, avaliando os níveis plasmáticos de D-Di por ensaio imunoturbidimétrico (*Liatest D-Di, Diagnostica Stago*) em 20 mulheres saudáveis nulíparas (idade=29,8±3 anos), antes da gravidez, no 1º trimestre (11-15 semanas) e no 3º trimestre (31-34 semanas). Do grupo avaliado, 17 gestantes tiveram gestações únicas sem complicações e três desenvolveram hipertensão após o 3º trimestre gestacional. Dessas, duas foram diagnosticadas com PE (proteinúria >300mg/dL e dois episódios de PA >140/90mmHg) e uma, além desses sintomas, apresentou elevação das enzimas hepáticas e do ácido úrico. Os critérios de exclusão adotados foram história de hipertensão prévia, doença autoimune, diabetes ou outras doenças que alteram a pressão sanguínea. Foi observado um aumento nos níveis plasmáticos de D-Di nas gestantes normotensas e nas que desenvolveram hipertensão, no 3º trimestre gestacional (0,97±0,10 e 0,96±0,25ng/mL) comparando com o período pré-gravidez (0,26±0,04 e 0,3±0,08ng/mL) e o 1º trimestre (0,49±0,06 e 0,45±0,04ng/mL). Não houve diferença entre os níveis de D-Di das gestantes que desenvolveram hipertensão e aquelas que tiveram gestação sem complicações.

*Gulec et al. (2012)* realizaram um estudo na Turquia, avaliando os níveis de D-Di por ensaio imunoturbidimétrico em 64 gestantes com PE, sendo 31 com PE leve e 33 com PE grave e 33 gestantes normotensas, no 3º trimestre gestacional. A média dos níveis de D-Di obtidos foi 1,12 ± 0,36mg/L para as gestantes normotensas e 2,57±1,73mg/L para as gestantes com PE. Nas gestantes com PE leve, a média de D-Di foi 2,06±1,43mg/L e naquelas com PE grave, foi 3,04 ±1,87mg/L. Houve correlação positiva entre os níveis de D-Di e a gravidade da doença.

Em uma meta-análise recente (*PINHEIRO et al., 2012*) foram selecionadas 194 publicações e após um rigoroso critério de seleção, que excluía os estudos com definição incorreta de PE, determinação de D-Di por outro método distinto de ELISA e ausência de grupo controle de gestantes normotensas, apenas sete estudos foram

incluídos na meta-análise: *Catarino et al., 2008; Dusse et al., 2003; He et al., 1997; Schjetlein et al., 1997; Terao et al., 1991; Bellart et al., 1998 e Hellmann et al., 2007.* Essa meta-análise incluiu apenas os estudos transversais nos quais os níveis de D-Di foram determinados por ELISA no 3º trimestre de gestação, publicados entre 1991 a 2008. A média dos valores de D-Di obtidos nesses estudos foi 222 a 1390ng/mL para as gestantes normotensas e 348 a 1545ng/mL para as pré-eclâmpticas. A mediana foi 183 a 1149ng/mL nas gestantes normotensas e 315 a 2090ng/mL nas pré-eclâmpticas. Apenas em um estudo não foi observada diferença nos níveis de D-Di entre normotensas e pré-eclâmpticas (CATARINO *et al.*, 2008). Dusse *et al.* (2003) obtiveram um aumento significativo de D-Di plasmático nas gestantes com PE grave, comparando-se àquelas com PE leve/moderada e às gestantes normotensas. Nos outros cinco estudos incluídos houve um aumento dos níveis de D-Di na PE em relação às gestantes normotensas.

Considerando que o D-Di origina-se exclusivamente da lise do coágulo de fibrina, seus níveis são proporcionais à taxa de formação e degradação da fibrina. Considerando, ainda, que a PE está associada à disfunção endotelial, ativação da coagulação e do sistema fibrinolítico, seria esperado um aumento de D-Di nessa doença. No entanto, uma série de limitações impede o estabelecimento de conclusões definitivas acerca dos valores de D-Di na PE, como: a definição dos critérios para o diagnóstico da PE, dos critérios de exclusão, a separação de grupos com diferentes formas clínicas da doença (precoce e tardia, leve e grave), além da diversidade de métodos utilizados para a determinação de D-Di.

Cumprе ressaltar que a maioria dos estudos observados na literatura incluiu gestantes no 3º trimestre da gravidez, apenas *Higgins et al.* (1998) e *Hale et al.* (2012) avaliaram as mesmas gestantes ao longo da gestação. Dessa forma, estudos longitudinais, com determinação dos níveis de D-Di ao longo da gravidez são fundamentais para estabelecer o *cut-off* para D-Di na PE e seu potencial preditivo para o estabelecimento da gravidade da doença.

## **2.8 PAI-1 na PE**

Está bem estabelecido que a PE esteja associada a um estado de hipercoagulabilidade mais evidente que a condição fisiológica da gravidez. A deposição de fibrina no subendotélio dos glomérulos renais, nas artérias espirais e

lesões oclusivas na vasculatura placentária foram relatadas em gestantes com PE (O'RIONDAN *et al.*, 2003).

*Estelles et al.* (1998) sugeriram que as manifestações clínicas da PE são secundárias à hipoperfusão resultante da deposição de fibrina em vários órgãos maternos, comprometendo a função desses. No entanto, ainda não há um consenso se o sistema fibrinolítico está ativado ou inibido na PE. Diversos estudos tem revelado uma significativa redução nos níveis de PAI-1 em gestantes pré-eclâmpticas, comparando as gestantes normotensas (HIGGINS *et al.*, 1998; CLARK *et al.*, 2001).

Paradoxalmente, outros estudos demonstraram um aumento dos níveis de PAI-1 e de t-PA nas gestantes com PE comparadas às normotensas (HALLIGAN *et al.*, 1994; BACHMANN, 1995; HELLGREN, 1996 e 2003; YIN *et al.*, 1998; ESTELLES *et al.*, 1998; SCHJETLEIN *et al.*, 1999; CHAPPELL *et al.*, 2002; TANJUNG, 2005; SUCAK *et al.*, 2006).

Sabendo que o PAI-1 e o t-PA são sintetizados pelas células endoteliais, não se pode descartar a hipótese que o aumento dos níveis plasmáticos desses marcadores na PE, reflita a disfunção endotelial que está associada a essa doença.

Sabe-se que a biossíntese do PAI-1 pode ser induzida por diversos fatores como TNF- $\alpha$ , hormônios e fatores de crescimento (KRUIHOF, 1988). *Estelles et al.* (1998) demonstraram um aumento significativo de TNF- $\alpha$  e PAI-1 em placentas de gestantes com PE grave o que sugere que o aumento de TNF- $\alpha$ , é o responsável pelo aumento da expressão local de PAI-1 placentário. O excesso de PAI-1 na placenta e a diminuição adicional da atividade fibrinolítica contribuiriam para a formação e persistência de microtrombos na circulação placentária.

*Roes et al.* (2002) demonstraram que os níveis de PAI-2 encontram-se significativamente reduzidos em gestantes com PE grave, o que refletiria a insuficiência placentária. Tem sido admitido que o PAI-1 exerce um papel mais significativo na regulação da fibrinólise, enquanto o PAI-2 parece exercer um papel local na função placentária durante a gravidez (PINHEIRO *et al.*, 2013).

*Schjetlein et al.* (1997) demonstraram um aumento da atividade do PAI-1 e uma diminuição nos níveis de PAI-2 em gestantes com PE leve e grave em relação às gestantes normotensas, no terceiro trimestre gestacional. As gestantes com PE,

cujos fetos apresentavam retardo do crescimento intra-uterino, tinham atividade reduzida de PAI-1 e níveis plasmáticos menores de PAI-2.

*Belo et al.* (2002) em um estudo envolvendo gestantes com PE, obtiveram um aumento dos níveis de PAI-1, t-PA e D-Di em relação às gestantes normotensas, no terceiro trimestre gestacional. Os valores de t-PA correlacionaram-se positivamente e significativamente com os graus de proteinúria nas gestantes com PE.

*Chappel et al.* (2002) propuseram que a razão entre PAI-1:PAI-2, avaliada entre a 20<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semanas gestacionais, poderia ser um potencial marcador preditivo de PE. Em concordância, *Parra et al.*, em 2005, relataram um aumento significativo da razão PAI-1:PAI-2 em gestantes entre 22<sup>a</sup> e 25<sup>a</sup> semanas de gestação, que desenvolveram PE subsequentemente, quando comparadas aquelas que mantiveram-se normotensas.

*Wikstrom et al.* (2009) demonstraram uma diminuição nos níveis de PAI-2, aumento do estresse oxidativo placentário, e aumento da razão PAI-1:PAI-2 na PE de início precoce, mas não na PE tardia, o que sugere uma associação entre PE de início precoce e anormalidade placentária. A razão PAI-1: PAI-2 tem sido apontada como uma ferramenta potencial para prever PE de início precoce.

Tem sido admitido que a ação anti-fibrinolítica do PAI-1 contribui para a manutenção do coágulo de fibrina, comprometendo a migração e invasão trofoblástica (LALA *et al.*, 2003). A produção diminuída de PAI-2 e o excesso de PAI-1, provavelmente refletem a lesão trofoblástica e endotelial, respectivamente, e tem sido obtida em gestantes com PE de origem caucasianas e asiáticas (KOH *et al.*, 1993; REITH *et al.*, 1993; TANJUNG *et al.*, 2005).

Sabe-se que o PAI-1 é uma proteína de fase aguda e sua elevação pode indicar uma condição fisiológica anormal (KRUIHOF, 1988). Dessa forma, pode-se inferir que, apesar dos níveis de t-PA estarem elevados na PE, o aumento de PAI-1 é mais evidente, contribuindo para a redução da atividade do sistema fibrinolítico observada nessa doença (PINHEIRO *et al.*, 2013).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o D-Di e PAI-1, como marcadores da coagulação e fibrinólise, ao longo da gestação, em gestantes portadoras de fatores de risco para PE, que desenvolveram e não desenvolveram a doença.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Determinar em gestantes portadoras de fatores de risco para PE que desenvolveram e não desenvolveram a doença, em quatro períodos da gestação (12-19 semanas, 20-29 semanas, 30-34 semanas, 35-40 semanas), os níveis plasmáticos de D-Di e de PAI-1.

- Comparar os níveis plasmáticos de D-Di e PAI-1 nas gestantes que desenvolveram e não desenvolveram PE, em cada período gestacional, ao longo da gestação.

- Comparar os níveis plasmáticos de D-Di e PAI-1 de cada gestante (nas que desenvolveram e que não desenvolveram PE) nos períodos gestacionais avaliados.

- Determinar o valor de D-Di, do PAI-1 e da razão D-Di/PAI-1 para auxiliar no diagnóstico precoce da PE.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Casuística**

#### **4.1.1 Aspectos éticos**

Este estudo foi previamente analisado, sob o ponto de vista ético e formal, e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (ETIC 0618.0.203.000-10) (**ANEXO A**). O esclarecimento dos objetivos da pesquisa foi feito pelos pesquisadores, utilizando-se linguagem clara, a todas as mulheres integrantes do estudo. Todas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### **4.1.2 Seleção das participantes do estudo**

Este estudo longitudinal incluiu 28 gestantes das 100 selecionadas e acompanhadas durante o período gestacional no ambulatório pré-natal de alto risco do Centro de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas da UFMG. Todas as gestantes incluídas no estudo apresentavam fatores de risco para ocorrência de PE.

Os dados clínicos e laboratoriais de interesse foram coletados no prontuário médico.

As gestantes foram distribuídas em dois grupos conforme a evolução da gestação:

Grupo I (n=11): Gestantes que desenvolveram PE.

Grupo II (n=17): Gestantes que não desenvolveram PE.

#### **4.1.2.1 Fatores de risco para PE**

As gestantes incluídas no estudo apresentavam pelo menos um dos fatores a seguir:

- PE em gestação anterior
- Primipaternidade
- Etnia não branca
- Limite inferior da idade fértil
- Hipertensão prévia

Os critérios para o diagnóstico de PE foram:

- Mínimo de dois episódios de pressão sistólica/diastólica  $\geq 140/90$ mmHg (o intervalo entre as medições não deve ser inferior a 6 horas) e/ou;
- Proteinúria superior a 0,3g/L em urina de 24 horas e/ou maior que (+), em amostras isoladas, pelo método semi-quantitativo de fita e/ou;
- Sintomas clínicos (edema nas mãos e face, cefaleia, distúrbios visuais, dor abdominal, náuseas e vômitos)

## 4.2 Amostra biológica

Foram coletadas amostras de 5mL de sangue em EDTA, diretamente em tubos do Sistema BD Vacutainer®, devidamente identificados, das 28 gestantes participantes do estudo nos quatro períodos da gestação:

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

As amostras foram imediatamente centrifugadas a 3000rpm à temperatura ambiente por 15 minutos e alíquotas de plasma foram transferidas para tubos eppendorf e mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização dos testes laboratoriais.

No total, foram coletadas 23 amostras das 11 gestantes que desenvolveram PE, sendo:

- 12 a 19 semanas (n=6)
- 20 a 29 semanas (n=11)
- 30 a 34 semanas (n=4)
- 35 a 40 semanas (n=2)

Das 17 gestantes que não desenvolveram PE, foram coletadas 55 amostras, sendo:

- 12 a 19 semanas (n=13)
- 20 a 29 semanas (n=15)
- 30 a 34 semanas (n=17)
- 35 a 40 semanas (n=10)

### 4.3 Métodos

O acompanhamento clínico das gestantes participantes do estudo, incluiu a aferição da pressão arterial em três momentos distintos durante a gestação (na inclusão do estudo, no 2º trimestre e no momento da internação para o parto) e a dosagem da proteinúria em urina de 24 horas e/ou pelo método semi-quantitativo de fita no momento da internação para o parto.

As determinações dos níveis plasmáticos de D-Di e PAI-1 foram feitas por ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura.

#### 4.3.1 Determinação do D-Di

A determinação do D-Di plasmático foi feita, utilizando-se o Kit IMUCLONE® D-Dimer ELISA (Sekisui Diagnostics, LLC, Stamford, USA), seguindo rigorosamente as instruções do fabricante.

O princípio do teste consiste na captura dos antígenos D-Di presentes nos plasmas testados, por anticorpos monoclonais, fixados na superfície de uma placa. Os antígenos não capturados são retirados por lavagens sucessivas. Em seguida, adicionam-se anticorpos monoclonais (conjugados com peroxidase), que vão se ligar a determinantes antigênicos do D-Di (capturados na etapa anterior), distintos daqueles ligados aos primeiros anticorpos. Os anticorpos conjugados com peroxidase (*horseradish* peroxidase – HRP) que não se ligaram ao D-Di são, posteriormente, retirados por lavagens sucessivas. A revelação dos antígenos capturados na primeira etapa é feita pela determinação da reação da enzima peroxidase (HRP) ligada ao segundo anticorpo, com o substrato TMB (perborato 3, 3', 5, 5' – tetrametilbenzidina), gerando um produto de coloração azul. Essa reação é interrompida pela adição de ácido sulfúrico e a cor torna-se amarela. A intensidade da cor produzida (determinada fotometricamente) é diretamente proporcional à concentração de D-Di na amostra plasmática.

A leitura das reações foi feita utilizando-se o leitor de microplacas *VersaMax Microplate Reader* – MOLECULAR DEVICES (USA). A concentração de D-Di de cada plasma testado foi obtida interpolando-se as leituras das amostras em uma curva padrão (valores de absorbância obtidos para cada padrão de D-Di x sua concentração correspondente em ng/mL). A concentração foi multiplicada pelo fator

de diluição utilizado, sendo que nas amostras das gestantes de 12 a 19 e 20 a 29 semanas, a diluição foi 1:20 e os resultados obtidos foram multiplicados por 20. Nas amostras das gestantes de 30 a 34, 35 a 40 semanas e nos controles *high e low* fornecidos, a diluição foi 1:50, e os resultados foram multiplicados por 50. Os valores de referência fornecidos pelo fabricante para os controles *high e low*, cujos valores eram 2288ng/mL (1945-2631ng/mL) e 122ng/mL (<400ng/mL) foram obtidos, respectivamente, 2550 e 400ng/mL.

O valor de referência da concentração de D-Di no plasma humano normal, de acordo com o fabricante, é usualmente menor que 400ng/mL.

#### **4.3.2 Determinação do PAI-1**

A determinação do PAI-1 plasmático foi feita utilizando-se o Kit IMUBIND® Plasma PAI-1 ELISA (Sekisui Diagnostics, LLC, Stamford, USA), seguindo rigorosamente as instruções do fabricante.

O princípio do teste consiste na captura dos antígenos PAI-1 presentes nas amostras de plasma testadas, por anticorpos monoclonais (anti-PAI-1), fixados na superfície de uma placa, durante um período de incubação. Os antígenos não capturados são retirados por lavagens sucessivas. Em seguida, adicionam-se anticorpos monoclonais (conjugados com peroxidase), que vão se ligar a determinantes antigênicos do PAI-1 (capturados na etapa anterior), distintos daqueles ligados aos primeiros anticorpos. Os anticorpos conjugados com peroxidase (*ortho-phenylenediamine* - OPD) que não se ligaram ao PAI-1 são, posteriormente, retirados por lavagens sucessivas. A revelação dos antígenos capturados na primeira etapa é feita pela determinação da reação da enzima peroxidase (OPD) ligada ao segundo anticorpo, com o substrato OPD, gerando um produto de coloração amarela. Essa reação é interrompida pela adição de ácido sulfúrico e a cor torna-se laranja. A absorbância da solução é determinada em 490nm. A intensidade da cor produzida (determinada fotometricamente) é diretamente proporcional à concentração de PAI-1 na amostra plasmática.

A leitura das reações foi feita utilizando-se o leitor de microplacas *VersaMax Microplate Reader* – MOLECULAR DEVICES (USA). A concentração de PAI-1 de cada plasma testado foi obtida interpolando-se as leituras das amostras em uma curva padrão (valores de absorbância obtidos para cada padrão de PAI-1 x sua

concentração correspondente em ng/mL). A concentração foi multiplicada pelo fator de diluição utilizado, sendo que nas amostras das gestantes de 35 a 40 semanas, a diluição foi 1:10 e, portanto, os resultados foram multiplicados por 10.

A faixa de referência, fornecida pelo fabricante, para os níveis plasmáticos de PAI-1, utilizando amostras de plasma com citrato em um grupo de 167 adultos saudáveis, foi de 2 a 47ng/mL para 95% das amostras. No entanto, o mesmo recomenda que cada laboratório determine a sua faixa de normalidade para plasmas colhidos em citrato e EDTA.

O ensaio quantifica várias formas de PAI-1 (ativas e inativas e PAI-1 complexado com t-PA e u-PA). O limite inferior de detecção é de 2,2 ng/mL e a variação intra-ensaio do ELISA para amostras com 40ng/mL é de 5,4%.

#### 4.4 Análise Estatística

Os dados foram analisados empregando-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>*).

A primeira análise estatística constituiu na comparação dos níveis plasmáticos de D-Di e PAI-1 dos dois grupos de gestantes, que desenvolveram e que não desenvolveram PE, nos quatro períodos gestacionais avaliados. O teste *Shapiro-Wilk* foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. Para os dados que não se apresentaram com distribuição normal, foi obtida a raiz quadrada e, novamente o teste de *Shapiro-Wilk* foi feito e estes apresentaram distribuição normal. O teste de F foi utilizado para verificar a homogeneidade das variâncias dos grupos avaliados, sendo que um valor de  $p > 0,05$  indicou que não havia diferença significativa entre as variâncias. Posteriormente, o teste-t independente foi utilizado para comparação das médias dos grupos dois a dois. O teste-t independente foi realizado separadamente para os grupos com variâncias diferentes e para os grupos com variâncias iguais. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

A segunda análise estatística constitui na comparação dos níveis de D-Di e PAI-1 de cada gestante, ao longo da gestação. Inicialmente foi avaliada a normalidade dos dados utilizando o teste *Shapiro-Wilk* e essa foi normal. A homogeneidade das variâncias dos grupos foi avaliada pelo teste de F, sendo que um valor de  $p > 0,05$  indicou que não havia diferença significativa entre as variâncias.

Posteriormente, a diferença entre as médias dos grupos analisados foi avaliada por Análise de Variância (ANOVA) e um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. O teste-t independente foi utilizado para comparação das médias dos grupos dois a dois. O teste-t independente foi realizado separadamente para os grupos com variâncias diferentes e para os grupos com variâncias iguais. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Para a comparação das medianas da idade das gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, foi utilizado o Teste Mann-Whitney. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Características clínicas e epidemiológicas dos grupos avaliados

As características clínicas das gestantes que desenvolveram PE e daquelas que não desenvolveram a doença estão apresentados na **Tabela 1**.

**Tabela 1 – Características clínicas e epidemiológicas das participantes do estudo.**

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

PA: pressão arterial; sist: sistólica; diast: diastólica; IMC: Índice de massa corporal; <sup>a</sup>Teste Mann-Whitney. Os dados não paramétricos são apresentados como mediana. <sup>b</sup>Teste t de student; \*p<0,05 = estatisticamente significativo.

A comparação estatística dos dados idade ( $p=0,239$ ), altura ( $p=0,168$ ), peso ( $p=0,142$ ), IMC ( $p=0,094$ ) entre as gestantes que desenvolveram PE e aquelas que não desenvolveram PE, revelou que não houve diferença significativa entre as médias/medianas dos grupos analisados, como mostra a **Tabela 1**.

Os valores de pressão sistólica ( $p=0,001$ ) e diastólica ( $p=0,001$ ) foram diferentes entre os grupos analisados apenas no momento da internação para o parto. Nos períodos da inclusão do estudo e na segunda aferição da pressão arterial das gestantes participantes, feita no segundo trimestre da gestação, não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos.

Em relação ao número de gestações, observa-se uma mediana ligeiramente maior no grupo das gestantes que desenvolveram PE em comparação ao grupo das gestantes que não desenvolveram PE (**Tabela 1**).

Apenas uma gestante que desenvolveu PE, possuía histórico de abortos (dois abortos), com relato de duas gestações anteriores com sucesso. Em relação à proteinúria, todas as gestantes apresentaram resultado positivo, acima dos valores de referência, seja pelo método qualitativo de fita ( $\geq 1$ ) ou pela urina de 24 horas ( $\geq 0,3$  g em urina de 24 horas).

Todas as gestantes selecionadas para o estudo apresentaram pelo menos um fator de risco para o desenvolvimento de PE, sendo os mais comuns o histórico de PE, a primipaternidade e a etnia não branca.

Dentre as gestantes que desenvolveram PE, o tipo de parto mais comum foi a cesárea tendo sido feita em oito gestantes (73%). Uma delas evoluiu para síndrome HELLP (9,1%) e outra desenvolveu diabetes gestacional (9,1%).

Com relação às gestantes que não desenvolveram PE, nenhuma possuía histórico de abortos. Todas apresentaram pelo menos um fator de risco para o desenvolvimento de PE, incluindo histórico de PE, a primipaternidade e etnia não branca. Uma gestante evoluiu com um quadro de diabetes gestacional e essa relatou ocorrência de PE em gestação anterior.

Sete das gestantes que não desenvolveram PE tiveram parto vaginal e sete realizaram parto cesárea (63,6%).

## 5.2 Níveis plasmáticos de D-Di nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, em cada período gestacional

As médias e desvios-padrão (DP) dos níveis plasmáticos do D-Di nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, nos quatro períodos da gestação (12-19 semanas, 20-29 semanas, 30-34 semanas, 35-40 semanas) estão apresentados nas **Tabelas 2 e 3**, respectivamente.

**Tabela 2 – Níveis plasmáticos de D-Di nas gestantes que desenvolveram PE, nos quatro períodos da gestação (12-19, 20-29, 30-34 e 35-40 semanas).**

<b>Período gestacional</b>	<b>D-Di (ng/mL) (Média±DP)</b>
<b>12-19 semanas (n=6)</b>	615,33±98,00
<b>20-29 semanas (n=11)</b>	950,28±591,12
<b>30-34 semanas (n=4)</b>	1799,20±464,19
<b>35-40 semanas (n=2)</b>	2070,30±233,91

**Tabela 3 – Níveis plasmáticos de D-Di nas gestantes que não desenvolveram PE, nos quatro períodos da gestação (12-19, 20-29, 30-34 e 35-40 semanas).**

<b>Período gestacional</b>	<b>D-Di (ng/mL) (Média±DP)</b>
<b>12-19 semanas (n=13)</b>	697,34±308,10
<b>20-29 semanas (n=15)</b>	846,48±307,75
<b>30-34 semanas (n=17)</b>	1682,28±965,04
<b>35-40 semanas (n=10)</b>	1975,88±726,51

A comparação das médias dos níveis plasmáticos de D-Di nas gestantes que desenvolveram PE e naquelas que não desenvolveram, para cada período gestacional, foi feita utilizando o teste t independente (**Tabela 4**).

**Tabela 4 – Níveis plasmáticos de D-Di nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, para cada período gestacional.**

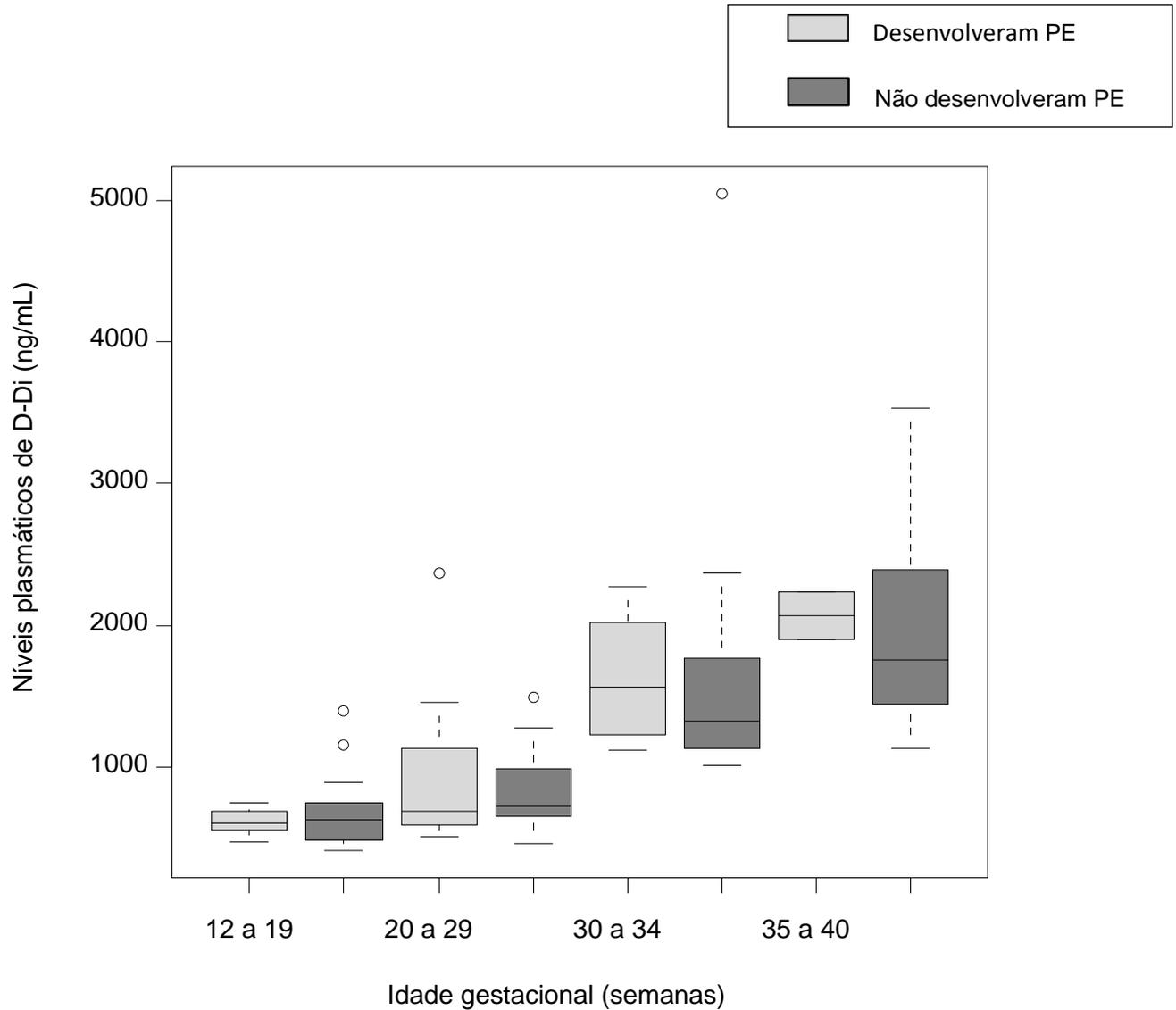
<b>Desenvolveram PE x Não desenvolveram PE</b>	<b>t</b>	<b>p</b>
<b>12-19 semanas</b>	-0,8409	0,414
<b>20-29 semanas</b>	0,4834	0,638
<b>30-34 semanas</b>	0,2023	0,842
<b>35-40 semanas</b>	0,1758	0,864

Comparação estatística feita pelo teste t independente, sendo que 12-19 e 20-29 semanas a variância foi diferente e para 30-34 e 35-40 semanas, a variância foi igual.  $p < 0.05$  = estatisticamente significativo.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as médias de nenhum dos períodos gestacionais avaliados, comparando-se as gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE.

A **Figura 6** ilustra a mediana, o intervalo interquartil (25 e 75%) e observações máxima e mínima dos níveis plasmáticos de D-Di dos grupos de gestantes que desenvolveram PE (□) e não desenvolveram a doença (■) nos quatro períodos gestacionais avaliados.

**Figura 6 – Comparação dos níveis plasmáticos de D-Di (ng/mL) nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, nos quatro períodos gestacionais avaliados. A mediana (linha horizontal), os quartis 25% e 75% (caixa cinza) e as observações máxima e mínima (linhas verticais) são mostrados na figura.**



A análise da **Figura 6** mostra que houve uma tendência de elevação dos níveis plasmáticos de D-Di nas gestantes que desenvolveram PE, comparando-se com aquelas que não desenvolveram a doença, especialmente nos períodos gestacionais de 30-34 e 35-40 semanas. No entanto, a comparação estatística das médias não revelou diferença entre os dois grupos.

### 5.3 Comparação dos níveis plasmáticos de D-Di em cada gestante (que desenvolveram e que não desenvolveram PE), nos quatro períodos gestacionais avaliados

A comparação dos níveis plasmáticos de D-Di, nos quatro períodos gestacionais avaliados, das gestantes que desenvolveram PE, feita por Análise de variância (ANOVA) revelou que houve diferença entre as médias dos grupos analisados ( $p < 0,001$ ). A localização da diferença foi feita utilizando o teste-t independente para comparar os períodos gestacionais dois a dois (**Tabela 5**).

**Tabela 5 – Comparação dos níveis plasmáticos de D-Di, nos quatro períodos gestacionais avaliados, das gestantes que desenvolveram PE.**

Períodos gestacionais	t	P
12 a 19 x 20 a 29 semanas	-1,665	0,130
12 a 19 x 30 a 34 semanas	-4,36	0,045*
12 a 19 x 35 a 40 semanas	-13,61	<0,001*
20 a 29 x 30 a 34 semanas	-2,24	0,048*
20 a 29 x 35 a 40 semanas	-2,54	0,030*
30 a 34 x 35 a 40 semanas	-1,11	0,330

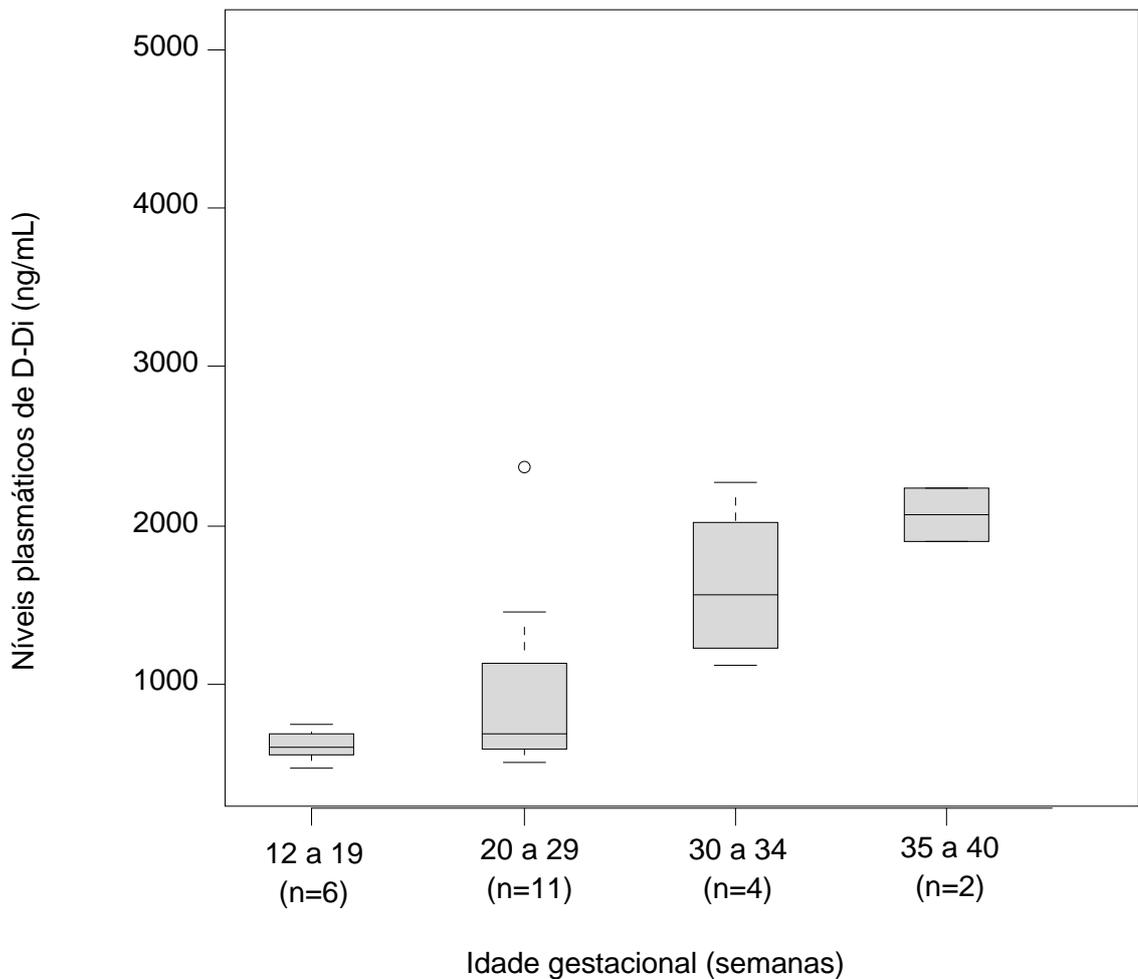
Comparação feita pelo teste t, sendo que 12-19 x 20-29 semanas e 12-19 x 30-34 semanas apresentaram variâncias diferentes e os demais apresentaram variâncias iguais. \* $p < 0,05$  = estatisticamente significativo.

Foi observado um aumento significativo nos níveis plasmáticos de D-Di nas gestantes que desenvolveram PE, comparando-se os períodos gestacionais 12-19 semanas com 30-34 semanas ( $p = 0,045$ ) e 35-40 semanas ( $p < 0,001$ ). Também foi encontrado um aumento significativo dos níveis plasmáticos de D-Di comparando os períodos 20-29 semanas com 30-34 semanas ( $p = 0,048$ ) e 35-40 semanas ( $p = 0,03$ ).

Para as comparações dos níveis plasmáticos de D-Di nos períodos gestacionais 12-19x20-29 semanas ( $p = 0,130$ ) e 30-34x 35-40 semanas ( $p = 0,330$ ) não foram obtidas diferenças significativas.

A **Figura 7** mostra a mediana, o intervalo interquartil (25 e 75%) e observações máxima e mínima dos níveis plasmáticos de D-Di, nos quatro períodos gestacionais, no grupo de gestantes que desenvolveram PE.

**Figura 7 – Níveis plasmáticos de D-Di (ng/mL) nos quatro períodos gestacionais, no grupo de gestantes que desenvolveram PE. A mediana (linha horizontal), quartis 25% e 75% (caixa cinza) e observações máxima e mínima (linhas verticais) são mostradas na figura.**



A análise da **Figura 7** revela que os níveis plasmáticos de D-Di foram aumentando nas gestantes que desenvolveram PE nos períodos gestacionais analisados, embora não tenha sido obtida diferença significativa comparando-se as médias dos períodos gestacionais de 12-19 x 20-29 semanas e 30-34 x 35-40 semanas.

A comparação dos níveis plasmáticos de D-Di, nos quatro períodos gestacionais avaliados, das gestantes que não desenvolveram PE, feita por Análise de variância (ANOVA) revelou que houve diferença entre as médias dos grupos

analisados ( $p < 0,001$ ). A localização da diferença foi feita utilizando o teste-t independente para comparar os períodos gestacionais dois a dois (**Tabela 6**).

**Tabela 6 – Comparação dos níveis plasmáticos de D-Di, nos quatro períodos gestacionais avaliados, das gestantes que não desenvolveram PE.**

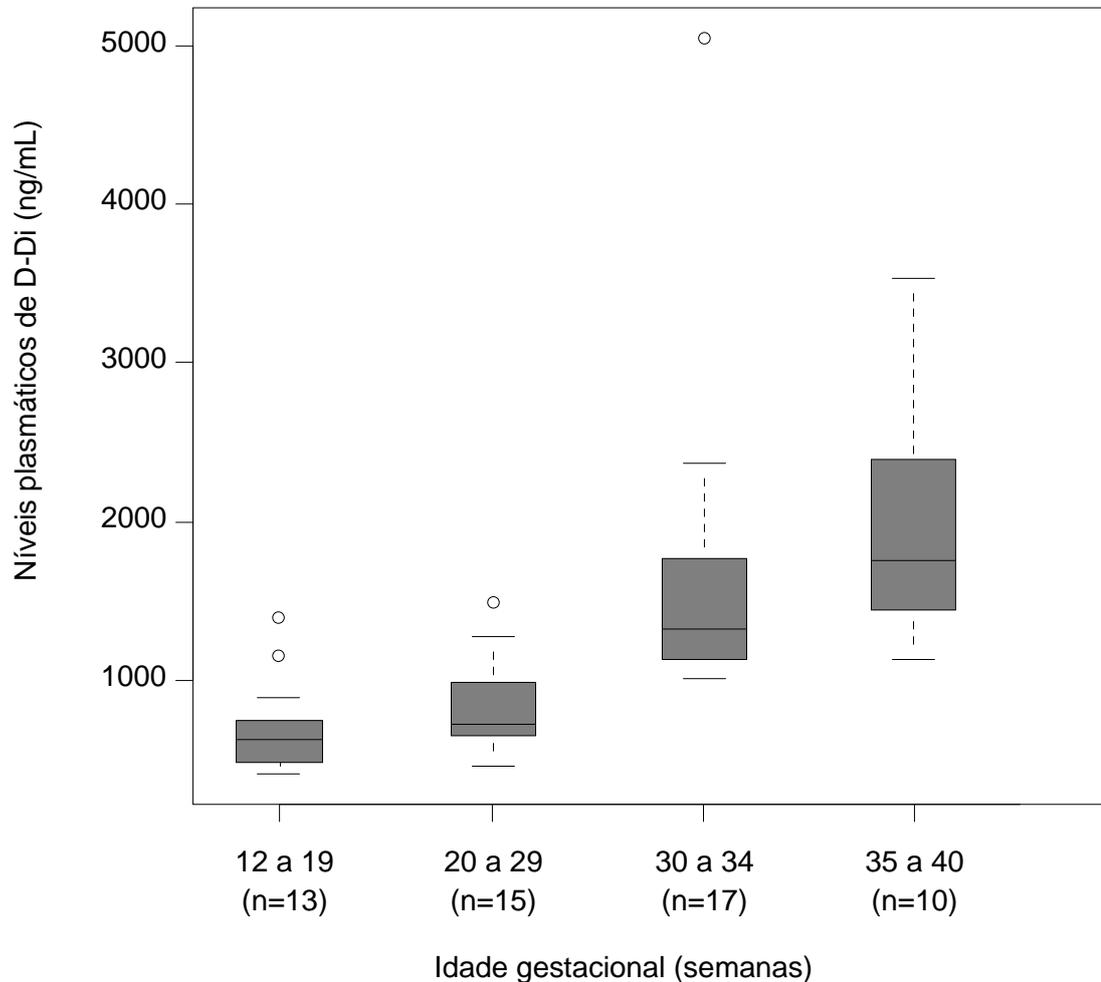
Períodos gestacionais	t	P
12 a 19 x 20 a 29 semanas	-1,2	0,239
12 a 19 x 30 a 34 semanas	-3,972	0,001*
12 a 19 x 35 a 40 semanas	-5,242	0,000*
20 a 29 x 30 a 34 semanas	-3,4682	0,003*
20 a 29 x 35 a 40 semanas	-4,742	0,001*
30 a 34 x 35 a 40 semanas	-0,895	0,380

Comparação feita pelo teste t, sendo que 12-19 x 20-29 semanas e 30-34 x 35-40 semanas apresentaram variâncias iguais e os demais apresentaram variâncias diferentes. \* $p < 0,05$  = estatisticamente significativo.

Um aumento significativo nos níveis plasmáticos de D-Di nas gestantes que não desenvolveram PE foi obtido comparando os períodos gestacionais 12-19x35-40 semanas ( $p=0,000$ ), 20x29x30-34 semanas ( $p=0,003$ ), 20x29x35-40 semanas ( $p=0,001$ ) e 12-19x30-34 semanas ( $p=0,001$ ). Para as demais comparações não foi obtida diferença significativa entre as médias.

A **Figura 8** mostra a mediana, o intervalo interquartil (25 e 75%) e observações máxima e mínima dos níveis plasmáticos de D-Di, nos quatro períodos gestacionais, no grupo de gestantes que não desenvolveram PE, estão apresentadas a seguir.

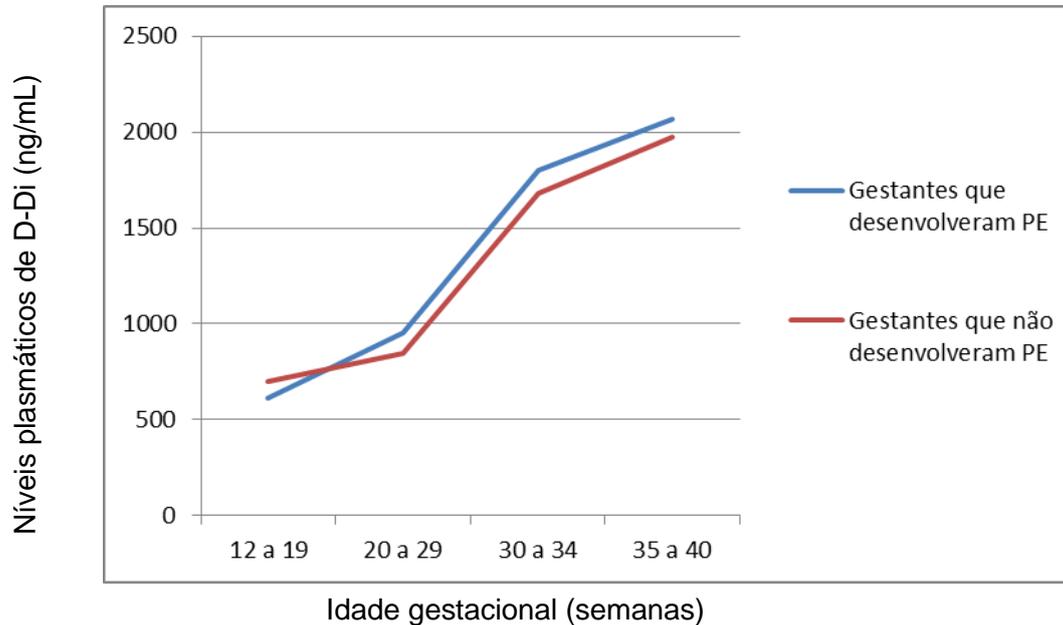
**Figura 8** - Níveis plasmáticos de D-Di (ng/mL) nos quatro períodos gestacionais, no grupo de gestantes que não desenvolveram PE. A mediana (linha horizontal), quartis 25% e 75% (caixa cinza) e observações máxima e mínima (linhas verticais) são mostradas na figura.



A análise da **Figura 8** revela que a mediana dos níveis plasmáticos de D-Di foi aumentando nas gestantes que não desenvolveram PE nos períodos gestacionais analisados, embora não tenha sido obtida diferença significativa comparando-se as médias dos períodos gestacionais de 12-19 x 20-29 semanas e 30-34 x 35-40 semanas.

A **Figura 9** mostra as médias dos níveis plasmáticos de D-Di nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE nos quatro períodos gestacionais avaliados.

**Figura 9** – Níveis plasmáticos de D-Di (ng/mL) nos grupos de gestantes que desenvolveram PE (–) e que não desenvolveram PE (–), nos quatro períodos gestacionais avaliados.



A análise da **Figura 9** revela que houve uma tendência de aumento da média dos níveis plasmáticos de D-Di nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, ao longo da gestação. No entanto, a análise estatística não revelou diferença significativa comparando-se as médias de cada período gestacional nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram a doença.

#### **5.4 Níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, em cada período gestacional**

Os níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que desenvolveram e não desenvolveram PE, nos quatro períodos da gestação (12-19 semanas, 20-29 semanas, 30-34 semanas, 35-40 semanas) estão apresentados a seguir nas **Tabelas 7 e 8**, respectivamente.

**Tabela 7 – Níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que desenvolveram PE, nos quatro períodos da gestação (12-19 semanas, 20-29 semanas, 30-34 semanas, 35-40 semanas).**

<b>Período gestacional</b>	<b>PAI-1 (ng/mL)</b> <b>(Média±DP)</b>
<b>12-19 semanas (n=6)</b>	49,31±23,96
<b>20-29 semanas (n=11)</b>	52,98±13,56
<b>30-34 semanas (n=4)</b>	51,17±11,64
<b>35-40 semanas (n=2)</b>	158,80±26,58

**Tabela 8 – Níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que não desenvolveram PE, nos quatro períodos da gestação (12-19 semanas, 20-29 semanas, 30-34 semanas, 35-40 semanas).**

<b>Período gestacional</b>	<b>PAI-1 (ng/mL)</b> <b>(Média±DP)</b>
<b>12-19 semanas (n=13)</b>	32,58±14,90
<b>20-29 semanas (n=15)</b>	51,86±17,70
<b>30-34 semanas (n=17)</b>	61,92±13,94
<b>35-40 semanas (n=10)</b>	109,05±55,12

A comparação dos níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que desenvolveram PE e naquelas que não desenvolveram, para cada faixa de idade gestacional está apresentada na **Tabela 9**.

**Tabela 9 – Níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, para cada período gestacional.**

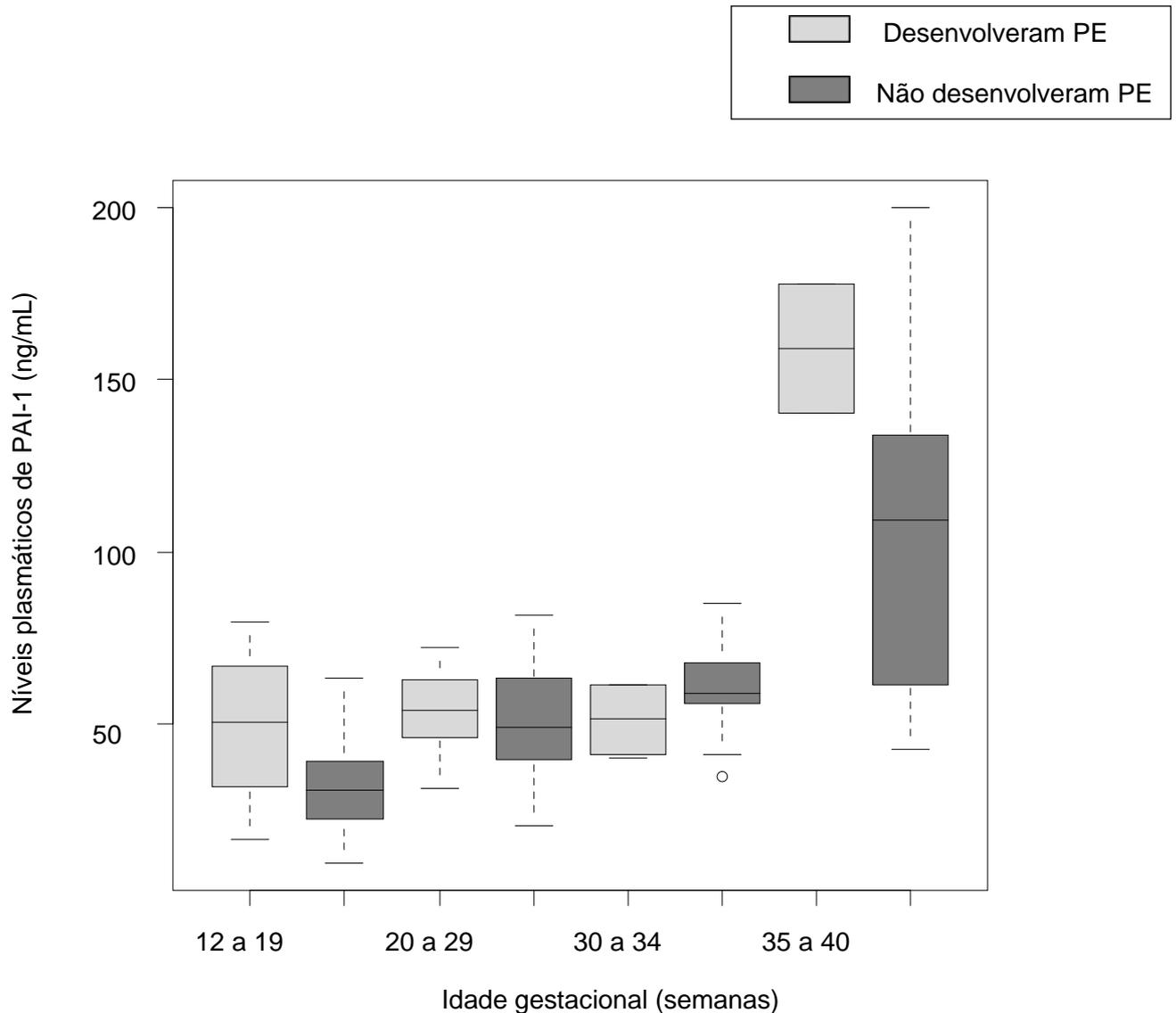
<b>Desenvolveram PE x Não desenvolveram</b>	<b>t</b>	<b>p</b>
<b>12-19 semanas</b>	1,8784	0,078
<b>20-29 semanas</b>	0,1744	0,863
<b>30-34 semanas</b>	-1,4225	0,1711
<b>35-40 semanas</b>	1,2126	0,2532

Comparação estatística feita pelo teste t independente para variâncias iguais.  $p < 0.05 =$  estatisticamente significativo.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa comparando-se as médias dos níveis plasmáticos de PAI-1 dos dois grupos nos quatro períodos gestacionais analisados.

A **Figura 10** ilustra a comparação da mediana, o intervalo interquartil (25 e 75%) e observações máxima e mínima dos níveis plasmáticos de PAI-1 dos grupos de gestantes que desenvolveram PE (□) e que não desenvolveram PE (■) nos quatro períodos gestacionais avaliados.

**Figura 10** – Comparação dos níveis plasmáticos de PAI-1 (ng/mL) nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, nos quatro períodos gestacionais avaliados. A mediana (linha horizontal), os quartis 25% e 75% (caixa cinza) e as observações máxima e mínima (linhas verticais) são mostrados na figura.



A análise da **Figura 10** mostra que houve uma tendência de aumento da mediana dos níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que desenvolveram PE, comparando-se aquelas que não desenvolveram a doença, em três períodos gestacionais avaliados. No entanto, a análise estatística não revelou diferença significativa em nenhuma das comparações das médias dos grupos analisados.

### 5.5 Comparação dos níveis plasmáticos de PAI-1 em cada gestante (que desenvolveu e que não desenvolveu PE), nos quatro períodos gestacionais avaliados

A comparação dos níveis plasmáticos de PAI-1, nos quatro períodos gestacionais avaliados, das gestantes que desenvolveram e não desenvolveram PE, feita por Análise de variância (ANOVA) revelou que houve diferença entre as médias dos grupos analisados ( $p < 0,001$ ). A localização da diferença foi feita utilizando o teste-t independente, comparando os períodos gestacionais dois a dois, de acordo com a (Tabela 10).

**Tabela 10 – Comparação dos níveis plasmáticos de PAI-1, nos quatro períodos gestacionais avaliados, das gestantes que desenvolveram PE.**

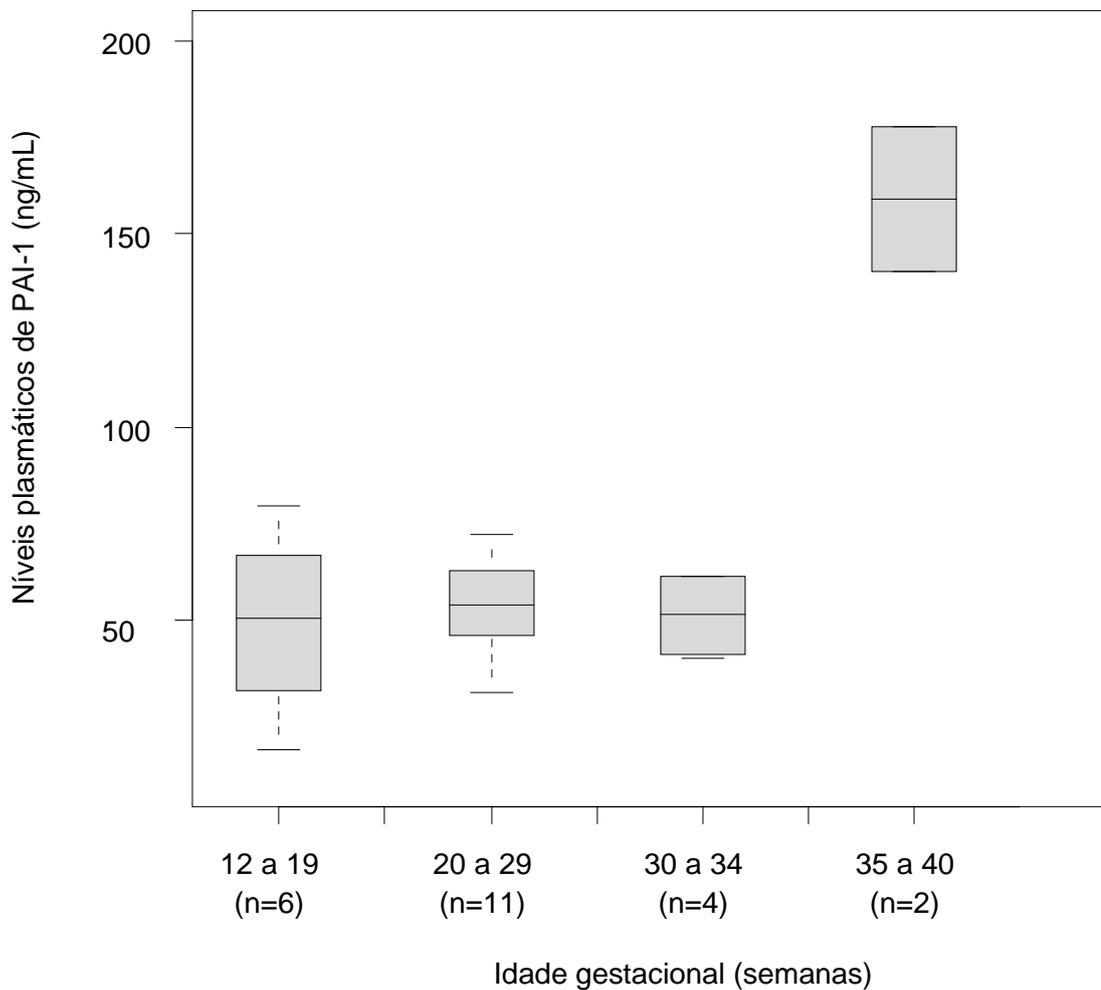
Períodos gestacionais	t	p
12 a 19 x 20 a 29 semanas	-0,405	0,69
12 a 19 x 30 a 34 semanas	-0,141	0,891
12 a 19 x 35 a 40 semanas	-5,4904	0,001*
20 a 29 x 30 a 34 semanas	0,235	0,817
20 a 29 x 35 a 40 semanas	-9,04	<0,001*
30 a 34 x 35 a 40 semanas	-7,447	<0,001*

Comparação feita pelo teste t para variâncias iguais. \* $p < 0.05$  = estatisticamente significativo.

Um aumento significativo nos níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que desenvolveram PE foi obtido no período de 35-40x12-19 semanas ( $p=0,001$ ), 35-40x20-29 semanas ( $p < 0,001$ ), 35-40x30-34 semanas ( $p < 0,001$ ). Para as demais comparações não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas entre as médias.

A **Figura 11** ilustra a mediana, o intervalo interquartil (25 e 75%) e observações máxima e mínima dos níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que desenvolveram PE, nos quatro períodos gestacionais avaliados.

**Figura 11 – Níveis plasmáticos de PAI-1 (ng/mL), nos quatro períodos gestacionais avaliados, nas gestantes que desenvolveram PE. A mediana (linha horizontal), quartis 25% e 75% (caixa cinza) e observações máxima e mínima (linhas verticais) são mostradas na figura.**



A análise da **Figura 11** mostra uma tendência ao aumento dos níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que desenvolveram PE, ao longo da gestação. No entanto, não foi obtida diferença significativa comparando-se as médias dos níveis de PAI-1 nos três primeiros períodos gestacionais.

A comparação dos níveis plasmáticos de PAI-1, nos quatro períodos gestacionais avaliados, das gestantes que não desenvolveram PE, feita por Análise de variância (ANOVA) revelou que houve diferença entre os grupos analisados ( $p < 0,001$ ). A localização da diferença foi feita utilizando o teste-t independente comparando os períodos gestacionais dois a dois, como mostra a **Tabela 11**.

**Tabela 11 – Comparação dos níveis plasmáticos de PAI-1, nos quatro períodos gestacionais avaliados, das gestantes que não desenvolveram PE.**

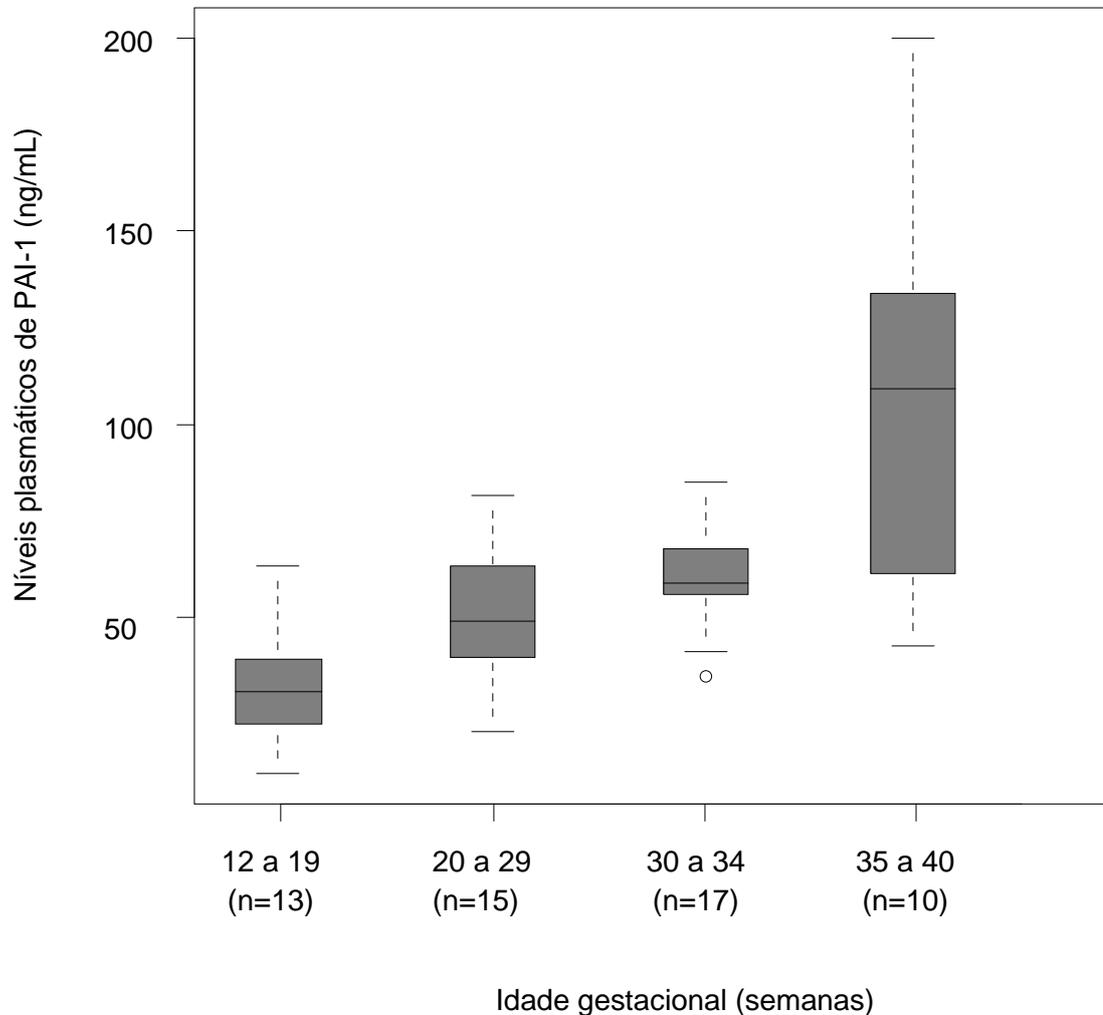
Períodos gestacionais	t	p
12 a 19 x 20 a 29 semanas	-3,09	0,004*
12 a 19 x 30 a 34 semanas	-5,544	<0,001*
20 a 29 x 30 a 34 semanas	-1,795	0,08
12 a 19 x 35 a 40 semanas	-4,268	0,001*
20 a 29 x 35 a 40 semanas	-3,173	0,009*
30 a 34 x 35 a 40 semanas	-3,38	0,002*

Comparação feita pelo teste-t, sendo que 12-19 x 20-29 semanas, 12-19 x 30-34 semanas e 20-29 x 30-34 semanas apresentaram variâncias iguais e os demais apresentaram variâncias diferentes. \* $p < 0,05$  = estatisticamente significativo.

Um aumento significativo nos níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que não desenvolveram PE foi obtido comparando-se os períodos 20-29x12-19 semanas ( $p=0,004$ ), 30-34 x12-19 semanas ( $p < 0,001$ ), 35-40x12-19 semanas ( $p=0,001$ ), 35-40x20-29 semanas ( $p=0,009$ ), 35-40x30-34 semanas ( $p=0,002$ ). Para as demais comparações não houve diferença significativa entre as médias.

A **Figura 12** ilustra a mediana, o intervalo interquartil (25 e 75%) e observações máxima e mínima dos níveis plasmáticos de PAI-1, nos quatro períodos gestacionais, nas gestantes que não desenvolveram PE.

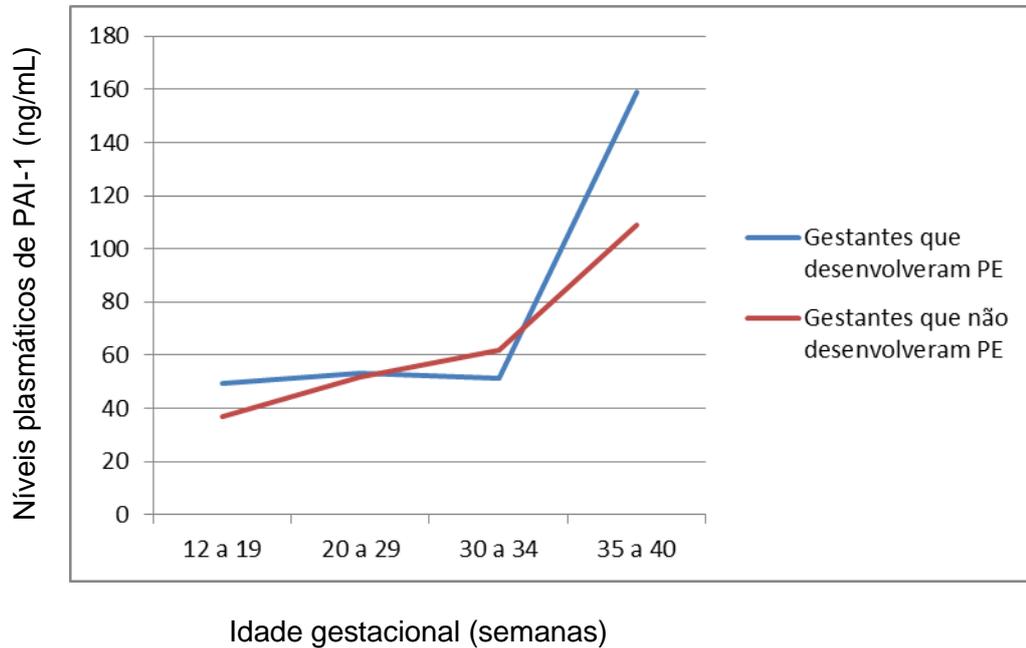
**Figura 12** – Níveis plasmáticos de PAI-1 (ng/mL) nos quatro períodos gestacionais, no grupo de gestantes que não desenvolveram PE. A mediana (linha horizontal), quartis 25% e 75% (caixa cinza) e observações máxima e mínima (linhas verticais) são mostradas na figura.



A análise da **Figura 12** mostra uma clara tendência de aumento dos níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que não desenvolveram PE, nos períodos gestacionais analisados, embora não tenha sido significativa a diferença obtida comparando-se as médias dos períodos 20-29 x 30-34 semanas.

A **Figura 13** ilustra as médias dos níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que desenvolveram e não desenvolveram PE nos quatro períodos gestacionais avaliados.

**Figura 13** – Níveis plasmáticos de PAI-1 (ng/mL) nas gestantes que desenvolveram PE (–) e que não desenvolveram PE (–), nos quatro períodos gestacionais avaliados.



A análise da **Figura 13** mostra que houve uma tendência de aumento da média dos níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, ao longo da gestação e essa foi mais evidente nas gestantes que desenvolveram PE. No entanto, a análise estatística não revelou diferença significativa comparando-se as médias obtidas de cada período gestacional nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram a doença.

### **5.6 Razão D-Di/PAI-1 nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, nos quatro períodos gestacionais avaliados**

A razão D-Di/PAI-1, dos períodos gestacionais avaliados, para as gestantes que desenvolveram PE e que não desenvolveram PE, estão apresentados na **Tabela 12**.

**Tabela 12 – Razão D-Di/PAI-1 nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, nos quatro períodos gestacionais.**

Período gestacional	Gestantes que desenvolveram PE (D-Di/PAI-1)	Gestantes que não desenvolveram PE (D-Di/PAI-1)
12 a 19 semanas	12,48 (n=6)	21,40 (n=13)
20 a 29 semanas	17,94 (n=11)	16,32 (n=15)
30 a 34 semanas	35,16 (n=4)	27,17 (n=17)
35 a 40 semanas	13,04 (n=2)	18,12 (n=10)

A análise da **Tabela 12** mostra uma tendência de aumento da relação D-Di/PAI-1 nas gestantes que desenvolveram PE, exceto no último período gestacional que incluiu apenas duas gestantes. Para as gestantes que não desenvolveram PE, essa tendência não foi observada.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Considerações iniciais

A PE está associada à elevada morbidade e mortalidade materna, fetal e neonatal. Além dessas complicações, em longo prazo, mulheres com histórico de PE apresentam maior risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BELLAMY *et al.*, 2008; MCDONALD *et al.*, 2008).

Acredita-se que alguns mecanismos fisiopatológicos da PE, que desencadeiam perfusão inadequada da placenta, também causam lesões irreparáveis à microvasculatura de outros órgãos maternos. Dessa forma, a PE pode contribuir para uma disfunção endotelial, especialmente dos capilares glomerulares renais (CETIN *et al.*, 2011). Mulheres com diabetes tipo-1, que tiveram PE previamente, possuem risco elevado de desenvolver nefropatia diabética (GORDIN *et al.*, 2007). Dessa forma, tem sido recomendado que mulheres com histórico de PE sejam monitoradas com controle rigoroso da pressão arterial, da função tireoidiana, da lipídemia e do peso, visando reduzir a morbidade e mortalidade (CETIN *et al.*, 2011).

Na PE, a circulação útero-placentária permanece em um estado de alta resistência, o que contribui para lesão endotelial generalizada, comprometimento da integridade vascular e formação de um processo aterosclerótico nas artérias, que resulta em isquemia local e necrose. Esse estado de alta resistência pode ser avaliado por um método não invasivo, o ultrassom com Doppler. Ao contrário das gestações normotensas, nas quais é obtida diminuição da impedância do fluxo sanguíneo nas artérias uterinas, na PE precoce a impedância está elevada. Dessa forma, o ultrassom com Doppler tem sido utilizado na tentativa de identificar gestantes de risco para o desenvolvimento de PE precoce (CETIN *et al.*, 2011).

Embora diversos fatores de risco estejam associados ao desenvolvimento de PE, tais fatores isolados não necessariamente estão associados à ocorrência da doença. A determinação no início da gestação de uma variedade de marcadores biológicos, bioquímicos e biofísicos envolvidos na patogênese da PE, tem sido proposta para auxiliar seu diagnóstico precoce. No entanto, nenhum marcador laboratorial que apresente relação custo-efetividade favorável foi proposto para o diagnóstico precoce da doença, sendo esse feito principalmente com base na

aferição da pressão arterial, determinação da proteinúria e nos sintomas clínicos (CETIN *et al.*, 2011).

Sabe-se que a aferição da pressão arterial está sujeita a alterações associadas à postura corporal, ausência de repouso prévio, complicações psicológicas e mostra-se elevada se a gestante estiver ansiosa ou estressada (ANGELI *et al.*, 2005; OGEDEGBE *et al.*, 2008).

A proteinúria é normalmente detectada por meio de fita reagente, uma vez que a determinação em urina de 24 horas é um método demorado, apesar de ser mais preciso. A detecção da proteinúria por meio de fita reagente pode fornecer resultados falsamente positivos se a urina estiver muito alcalina ou contaminada com amônia quaternária, clorhexidina bem como pelo corrimento vaginal (DAVEY e MACGILLIVRAY, 1988). Isto demonstra a dificuldade diagnóstica da PE, o que pode resultar em assistência médica não apropriada durante o pré-natal, além de constituir um fator de confusão importante no estudo desta doença.

A identificação de biomarcadores sensíveis e específicos para o diagnóstico preciso e precoce da PE é altamente necessária para a instituição de uma intervenção benéfica. Um marcador ideal deveria ser obtido utilizando um método não invasivo ou minimamente invasivo para a obtenção da amostra biológica (preferencialmente sangue ou urina), permanecer estável na amostra e não ser influenciado por outros parâmetros, como bilirrubina, hemoglobina, lipídeos, dentre outros. A determinação do marcador deve ser sensível e precisa e capaz de auxiliar no diagnóstico precoce da doença, antes de suas manifestações clínicas evidentes, de forma que medidas profiláticas possam ser adotadas com sucesso.

## **6.2 Características clínicas e epidemiológicas dos grupos avaliados**

No presente estudo foram avaliadas 28 gestantes ao longo dos quatro períodos gestacionais (12-19, 20-29, 30-34 e 35-40 semanas), sendo que 11 (39,3%) desenvolveram PE e 17 (60,7%) não desenvolveram a doença.

Todas as gestantes avaliadas apresentavam pelo menos um fator de risco para PE, sendo os mais frequentes a história de PE, a primipaternidade e a etnia não branca.

A análise das características clínicas e epidemiológicas das gestantes avaliadas revelou que não houve diferença significativa comparando-se a idade ( $p=0,239$ ), o peso ( $p=0,142$ ), a altura ( $p=0,168$ ) e o índice de massa corporal ( $p=0,094$ ) nos dois grupos. **(Tabela 1)** Estudos revelam que a PE ocorre com maior frequência em mulheres nulíparas (SIBAI *et al.*, 1995; YOUNG *et al.*, 2010). No entanto, no presente estudo, a mediana do número de gestações foi ligeiramente maior no grupo de gestantes que desenvolveram PE. Entre as gestantes que desenvolveram a doença, apenas quatro (36,4%) eram nulíparas e entre as gestantes que não desenvolveram a doença, oito (47,1%). O reduzido número de gestantes envolvidas neste estudo provavelmente justifica o menor percentual de gestantes nulíparas no grupo que desenvolveu PE.

A comparação dos níveis pressóricos na inclusão da gestante no estudo (no primeiro trimestre de gestação) e na segunda aferição (no segundo trimestre) não revelou diferença significativa entre os grupos, entretanto, as médias das PA sistólica e diastólica, em ambas as ocasiões, foram maiores nas gestantes que desenvolveram PE. A comparação dos níveis pressóricos no momento da internação para o parto revelou um aumento significativo desses nas gestantes que desenvolveram PE em relação às gestantes que não desenvolveram a doença. Este fato era esperado, uma vez que os níveis pressóricos  $\geq 140/90$ mmHg, em pelo menos duas ocasiões, constituíram um dos critérios de diagnóstico de PE.

Em relação ao tipo de parto, a cesárea foi a opção predominante nas gestantes que desenvolveram PE (72,7%), o que é justificado pelo risco associado à manutenção da gestação, tanto para a mãe, quanto para o bebê e por ser a remoção completa da placenta o único tratamento efetivo para a doença.

Dentre as gestantes que desenvolveram PE, quatro (36,4%) apresentaram PE grave. Vale ressaltar que a gestante que evoluiu para síndrome HELLP não estava caracterizada com PE grave, mas sim PE leve, o que revela as mazelas dessa doença, que pode ter desfechos inesperados. Isto reforça a importância da monitorização clínica rigorosa inclusive das gestantes que manifestam a forma leve da doença, de forma a prevenir a mortalidade fetal e/ou materna.

Uma análise cuidadosa da gestante que evoluiu para síndrome HELLP, revela que essa tinha 24 anos e a PA no momento da internação para o parto foi 130x87mmHg, proteinúria de fita de 2+ e diversos sintomas clínicos. Sua história gestacional mostra que teve três gestações e dois abortos. Em relação aos níveis

plasmáticos de D-Di e PAI-1, foram coletadas amostras apenas nos períodos gestacionais 12-19 e 20-29 semanas. Embora não tenha sido possível recuperar este dado, é provável que o parto tenha sido antecipado em consequência da síndrome HELLP.

Embora a proteinúria não constitua mais um critério diagnóstico obrigatório da PE, no presente estudo todas as gestantes que desenvolveram PE, apresentaram proteinúria, detectada pela urina de 24 horas (1,43g/24horas a 6,91g/24horas) ou pelo método qualitativo de fita (1+ a 4+). Todas gestantes que não desenvolveram PE, e apresentaram-se normotensas no momento da internação para o parto, apresentaram proteinúria negativa.

Das gestantes avaliadas, duas evoluíram para um quadro de diabetes gestacional, sendo uma do grupo que desenvolveu PE e outra do grupo que não desenvolveu a doença.

### 6.3 Níveis plasmáticos de D-Di nas gestantes avaliadas

A avaliação das médias de D-Di plasmático nas gestantes avaliadas no presente estudo revelou que não houve diferença estatisticamente significativa comparando-se as gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram a PE nos quatro períodos gestacionais avaliados (**Tabela 4**).

Dois únicos estudos foram encontrados na literatura acompanhando o mesmo grupo de gestantes e que também avaliaram os níveis de D-Di, em portadoras de fatores de risco para PE, ao longo da gravidez (HIGGINS *et al.* 1998; HALE *et al.* 2012). Em concordância com os resultados do presente estudo, esses também não obtiveram diferença significativa de D-Di, em nenhum dos períodos gestacionais, comparando as gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE.

*Higgins et al.* obtiveram os seguintes valores para as gestantes que não desenvolveram PE (18-24semanas=363ng/mL, 28-32semanas=475ng/mL, ≥33semanas=688ng/mL, 6 semanas pós parto=150ng/mL) e para as gestantes que desenvolveram PE (18-24semanas=370ng/mL, 28-32semanas=375ng/mL, ≥33semanas=728ng/mL, 6 semanas pós parto=100ng/mL). *Hale et al.*, por sua vez, obtiveram os seguintes valores para as gestantes que não desenvolveram PE (Pré-gravidez=0,26µg/mL, 11-15 semanas=0,49µg/mL, 31-34semanas=0,97µg/mL) e para as gestantes que desenvolveram PE (Pré-gravidez=0,30µg/mL, 11-15

semanas=0,45µg/mL, 31-34semanas=0,96µg/mL). Em concordância com os resultados do presente estudo, ambos estudos não obtiveram diferença significativa de D-Di, em nenhum dos períodos gestacionais, comparando as gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE.

No entanto, no presente estudo houve uma tendência nítida de elevação das medianas dos níveis plasmáticos de D-Di nas gestantes que desenvolveram PE, comparando-se àquelas que não desenvolveram a doença, especialmente nos períodos gestacionais de 30-34 e 35-40 semanas (**Figura 6**). O número reduzido de gestantes avaliadas provavelmente explica a não obtenção de diferença estatística entre as médias de D-Di nos dois grupos de gestantes avaliados.

É importante ressaltar que os níveis mais elevados de D-Di foram obtidos na única gestante que evoluiu para síndrome HELLP, sendo 638,2ng/mL no período de 12 -19 semanas e 1459,0ng/mL no período de 20-29 semanas.

Duas gestantes avaliadas desenvolveram diabetes gestacional, sendo uma do grupo que desenvolveu PE e outra do grupo que não desenvolveu. A comparação dos níveis de D-Di dessas duas gestantes revelou que esses foram mais elevados na gestante que desenvolveu PE, sendo 561,3 *versus* 479,1ng/mL no período gestacional 12-19 semanas e 590,9 *versus* 461,3ng/mL no período 20-29 semanas. Lamentavelmente a coleta de amostra da gestante que desenvolveu PE e diabetes gestacional não foi feita nos períodos gestacionais seguintes, o que pode ter ocorrido pela interrupção precoce da gestação. É oportuno destacar que a gestante que não desenvolveu PE e teve diabetes gestacional relatou a ocorrência de PE em gestação anterior. Isto reforça o caráter enigmático da PE, sabendo que a diabetes tipo 1 constitui um fator predisponente à PE e tem uma relação estreita com a diabetes gestacional.

Diversos estudos avaliaram os níveis de D-Di em gestantes com PE no terceiro trimestre de gestação e a quase totalidade desses obteve um aumento dos níveis em relação às gestantes normotensas (TERAO *et al.*, 1991; HE *et al.*, 1997; SCHJETLEIN *et al.*, 1997; ROYLE *et al.*, 1998; BELLART *et al.*, 1998; BELO *et al.*, 2002; DUSSE *et al.*, 2003; HEILMANN *et al.*, 2007; GULEC *et al.*, 2012). Apenas em três estudos, os níveis plasmáticos de D-Di foram similares nas gestantes pré-eclâmpticas e normotensas (PATERNOSTER *et al.*, 1996; CATARINO *et al.*, 2008; e XIONG *et al.*, 2011).

No presente estudo, a comparação dos níveis plasmáticos de D-Di nos quatro períodos gestacionais avaliados (12 a 19, 20 a 29, 30 a 34 e 35 a 40 semanas), nas gestantes que desenvolveram PE, revelou um aumento expressivo das medianas dos níveis plasmáticos de D-Di ao longo da gestação (**Figura 7**). A comparação dos níveis de D-Di em todos os períodos gestacionais entre si revelou um aumento significativo em todas as comparações, exceto para os períodos 12-19x20-29 semanas e 30-34x35-40 semanas (**Tabela 5**). Este achado reforça a hipercoagulabilidade crescente associada à PE. A não obtenção de diferença entre a média de D-Di comparando os períodos gestacionais 30-34 e 35-40, provavelmente se deve ao fato de ter apenas duas gestantes no período 35-40 semanas.

Em concordância, os dois únicos estudos encontrados na literatura que avaliaram os níveis plasmáticos de D-Di em diferentes períodos gestacionais, nas mesmas gestantes, também obtiveram um aumento crescente desses níveis ao longo da gravidez, nas gestantes que desenvolveram PE (HIGGINS *et al.* 1998; HALE *et al.*, 2012). *Higgins et al.* obtiveram os seguintes níveis plasmáticos de D-Di para as gestantes que desenvolveram PE nos quatro períodos avaliados (18-24semanas=370ng/mL, 28-32semanas=375ng/mL, ≥33semanas=728ng/mL, 6 semanas pós parto=100ng/mL) e *Hale et al.* obtiveram (Pré-gravidez=0,30µg/mL, 11-15semanas=0,45µg/mL, 31-34semanas=0,96µg/mL). É oportuno comentar que *Higgins et al.* utilizaram a mesma técnica para determinação do D-Di, empregada no presente estudo, a ELISA e *Hale et al.* utilizaram a imunoturbidimetria.

A comparação dos níveis de D-Di nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, ao longo da gestação mostra que houve uma tendência de aumento da média dos níveis plasmáticos de D-Di naquelas que desenvolveram PE, o que novamente reforça a hipercoagulabilidade crescente nessa doença (**Figura 9**). De fato, um acúmulo de fibrina na microvasculatura placentária e renal foi anteriormente relatado (O'RIONDAN *et al.*, 2003). A não obtenção de significância estatística comprando os níveis de D-Di obtidos para os dois grupos de gestantes nos quatro períodos gestacionais avaliados, provavelmente se deve ao pequeno número de amostras analisadas.

Para as gestantes que não desenvolveram PE, a comparação dos níveis plasmáticos de D-Di nos quatro períodos gestacionais avaliados (12 a 19, 20 a 29, 30 a 34 e 35 a 40 semanas) também revelou um aumento expressivo das medianas ao longo da gestação (**Figura 8**). A comparação entre os períodos gestacionais

avaliados mostrou um aumento significativo nos níveis plasmáticos de D-Di em todas as comparações, exceto para os períodos 12 a 19 x 20 a 29 semanas e 30 a 34 x 35 a 40 semanas (**Tabela 6**). O aumento de D-Di, ao longo da gravidez, confirma que a gestação está fisiologicamente associada a um estado de hipercoagulabilidade, que visa prevenir um sangramento exagerado no momento do parto.

Em concordância, dois estudos encontrados na literatura que avaliaram os níveis de D-Di, nas mesmas gestantes, ao longo da gestação, também obtiveram um aumento crescente desses. *Khalafallah et al.* (2012) avaliaram 632 gestantes nos três trimestres gestacionais, utilizando dois testes imunoturbidimétricos, o *D-Dimer Plus* (1º trimestre=168µg/L, 2º trimestre=212µg/L e 3º trimestre=330µg/L) e o *Innovance* (1º trimestre=0,53mg/L, 2º trimestre=1,01mg/L e 3º trimestre=1,95mg/L). Para ambos os testes foi obtido um aumento progressivo de D-Di, sendo que o *Innovance* apresentou maior sensibilidade. *Réger et al.* (2012) avaliaram 83 gestantes normotensas, também utilizando a imunoturbidimetria para determinação do D-Di nos três períodos gestacionais. Relataram que os níveis de D-Di foram aumentando gradualmente da 16ª (<250ng/mL) à 26ª (<309ng/mL) e 36ª (<541ng/mL) semanas gestacionais, com diferenças estatisticamente significantes entre as semanas gestacionais.

Diversos estudos encontrados na literatura, que avaliaram grupos de gestantes distintos em diferentes períodos gestacionais, também revelaram um aumento progressivo nos níveis plasmáticos de D-Di em condições fisiológicas (FRANCALANCI *et al.*, 1995; GIAVARINA *et al.*, 2001; KLINE *et al.*, 2005; HALILOGLU *et al.*, 2010; HANSEN *et al.*, 2011; HUI *et al.*, 2012; JEREMIAH *et al.*, 2012; JOLY *et al.*, 2013; KAWAGUCHI *et al.*, 2013; MURPHY *et al.*, 2014).

É importante destacar que, apesar dos inúmeros estudos, ainda não foi estabelecido o *cut-off* para os níveis de D-Di ao longo da gestação em condições fisiológicas. Isto se deve a variedade de testes empregados para determinação do D-Di, que utilizam diferentes anticorpos monoclonais e diferentes padrões de calibração, resultando em sensibilidades distintas dos testes, o que inviabiliza a comparação dos resultados. Cumpre ressaltar, ainda, as diferentes etnias das gestantes envolvidas nos estudos da literatura, o que dificulta o uso dos valores de referência para outras populações. De fato, os fabricantes de conjuntos diagnósticos sugerem que cada região estabeleça a faixa de referência para a população atendida.

A análise da **Figura 9** revela um aumento gradual de D-Di na gestação. No entanto, esse aumento é mais evidente e de forma proporcional, nas gestantes que desenvolveram PE em relação às que não desenvolveram. A não obtenção de diferença estatística significativa entre as médias de D-Di das gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE (nos quatro períodos gestacionais) provavelmente se deve ao número reduzido de amostras avaliadas neste estudo.

#### 6.4 Níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes avaliadas

As médias dos níveis plasmáticos de PAI-1 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, comparando as gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, nos quatro períodos gestacionais avaliados (**Tabela 9**). O número reduzido de gestantes avaliadas provavelmente explica esse resultado. No entanto, houve uma tendência de aumento da mediana dos níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que desenvolveram PE, comparando-se aquelas que não desenvolveram a doença, em três períodos gestacionais (12-19, 20-29 e 35-40 semanas), como mostra a **Figura 10**. Como o PAI-1 é sintetizado pelas células endoteliais, não se pode descartar a hipótese que a tendência de aumento dos níveis de PAI-1 na PE, reflita a disfunção endotelial que está associada a essa doença.

Em concordância com os resultados do presente estudo, o único relato da literatura, acompanhando o mesmo grupo de gestantes e que também avaliou os níveis de PAI-1, em portadoras de fatores de risco para PE, ao longo da gravidez, também não obteve diferença significativa comparando as gestantes que desenvolveram (Pré-gravidez=20,1ng/mL, 11-15semanas=24,7ng/mL, 31-34semanas=57,7ng/mL) e que não desenvolveram a doença (Pré-gravidez=17,3ng/mL, 11-15semanas=17,7ng/mL, 31-34semanas=66,4ng/mL) em nenhum dos períodos gestacionais avaliados (HALE *et al.* 2012).

A comparação dos níveis de PAI-1 nas duas gestantes que tiveram diabetes gestacional evidenciou um aumento desses, no período de 20-29 semanas, naquela que também desenvolveu PE (48,9ng/mL) em relação à que não desenvolveu (39,6ng/mL). Para o outro período avaliado nessas gestantes (12-19 semanas), não foi obtida diferença nos níveis de PAI-1. Uma revisão do prontuário clínico dessas

gestantes, para constatar a época do surgimento da diabetes seria interessante para esclarecer este dado.

Uma revisão da literatura mostra que a investigação da atuação do sistema fibrinolítico na PE tem resultado em conclusões paradoxais, onde uma hipofunção uma função inalterada e uma hiperfunção desse sistema comparando-se à gestação normotensa têm sido relatadas. *Higgins et al.* (1998) e *Clark et al.* (2001) evidenciaram uma diminuição dos níveis plasmáticos de PAI-1 em gestantes pré-eclâmpticas comparadas às normotensas. Em contrapartida, *Gow et al.* (1984) demonstraram níveis similares de PAI-1 nesses dois grupos. A maioria dos estudos da literatura, no entanto, revelou aumento dos níveis de PAI-1 em gestantes com PE comparadas às normotensas (*HALLIGAN et al.*, 1994; *YIN et al.*, 1998; *DUSSE*, 1999; *TANJUNG*, 2005; *SCHJETLEIN et al.*, 1999; *HELLGREN*, 2003 e 1996; *ESTELLES et al.*, 1998; *CHAPPELL et al.*, 2002; *BACHMANN*, 1995; *SUCAK et al.*, 2006).

*Hunt et al.* (2009) demonstraram um aumento nos níveis plasmáticos de PAI-1 em mulheres que posteriormente apresentaram evidência precoce de disfunção placentária e restrição do crescimento fetal. Sabendo que esses achados estão associados à PE, pode-se inferir uma diminuição da atividade fibrinolítica nessa doença.

*Chappel et al.* (2002), evidenciaram um aumento significativo da razão PAI-1:PAI-2 em gestantes entre 22<sup>a</sup> e 25<sup>a</sup> semanas de gestação, que desenvolveram PE subsequentemente, quando comparadas aquelas que mantiveram-se normotensas, o que sugere um aumento da produção de PAI-1 nessa doença.

*Wikstron et al.* (2009) relataram um aumento da razão PAI-1:PAI-2 na PE precoce, mas não na PE tardia. Esses investigadores sugerem o potencial dessa razão para prever o surgimento da PE precoce.

No presente estudo, não foi obtida diferença significativa comparando-se as médias dos níveis de PAI-1 nos três primeiros períodos gestacionais, para as gestantes que desenvolveram PE. A comparação das médias dos níveis de PAI-1 nos períodos gestacionais entre si, revelou um aumento no período 35-40 em relação aos demais (**Tabela 10**).

A análise da **Figura 11** mostra que houve uma tendência de aumento dos níveis plasmáticos de PAI-1 nas gestantes que desenvolveram PE, ao longo da gestação, especialmente no terceiro trimestre, o que permite inferir a inibição do

sistema fibrinolítico nessa doença, como anteriormente sugerido na literatura (HALLIGAN *et al.*, 1994; YIN *et al.*, 1998; DUSSE, 1999; TANJUNG, 2005; SCHJETLEIN *et al.*, 1999; HELLGREN, 2003 e 1996; ESTELLES *et al.*, 1998; CHAPPELL *et al.*, 2002; BELO *et al.* 2002; BACHMANN, 1995; SUCAK *et al.*, 2006).

Em concordância com os resultados obtidos no presente estudo, HALE *et al.*, (2012) também obtiveram um aumento nos níveis de PAI-1, em um mesmo grupo de gestantes que desenvolveram PE, no 3º trimestre de gestação em relação ao 1º.

Em relação às gestantes que não desenvolveram PE, a análise da **Figura 12** evidencia que os níveis plasmáticos de PAI-1 aumentaram ao longo da gravidez. A comparação das médias dos níveis de PAI-1 entre os períodos gestacionais, revelou um aumento significativo em todos, exceto para 20-29x30-34 semanas (**Tabela 11**).

Assim como na PE, na gestação normal não há um consenso sobre a atuação do sistema fibrinolítico. Estudos pioneiros indicavam uma redução da atividade fibrinolítica (BIEZENSKI *et al.*, 1958; SHAPER *et al.*, 1965; e MENON *et al.*, 1970), enquanto outros estudos revelaram um aumento dos níveis de t-PA e u-PA, sugerindo uma ativação do sistema fibrinolítico. Revelaram, também, um aumento dos níveis de PAI-1, que esses pesquisadores interpretaram como um mecanismo para compensar o aumento dos ativadores do plasminogênio (KOH *et al.*, 1992; HALIGAN *et al.*, 1994; BELO *et al.*, 2002).

Em concordância com os resultados obtidos no presente estudo, *Estelles et al.* (1989) encontraram um aumento da atividade do PAI-1, em 43 gestantes normotensas, do 1º para o 3º trimestre, utilizando dois métodos laboratoriais, o IRMA (0,64 para 2,57U/mL) e ELISA (11,74 para 34,86ng/mL). *Choi et al.* (2002) revelaram um aumento gradual dos níveis de PAI-1 nas gestantes normotensas, a partir do 2º trimestre gestacional ( $45,2 \pm 9,7$ ng/mL), atingindo concentração máxima no 3º trimestre ( $75,9 \pm 12,4$ ng/mL). Vale ressaltar que em ambos os estudos mencionados, as amostras avaliadas em cada trimestre gestacional, não correspondiam às mesmas gestantes, como foi realizado no presente estudo.

A análise da **Figura 13** revela um aumento gradual de PAI-1 na gestação. No entanto, esse aumento é mais evidente nas gestantes que desenvolveram PE, principalmente no último trimestre gestacional. A não obtenção de diferença estatística significativa entre as médias de PAI-1 das gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE (nos quatro períodos gestacionais) provavelmente se deve ao número reduzido de amostras avaliadas neste estudo.

## 6.5 Razão D-Di/PAI-1 nas gestantes avaliadas

A fibrinólise *in vivo* é regulada pelo balanço entre os ativadores do plasminogênio (t-PA e u-PA) e os inibidores dos ativadores do plasminogênio (PAI-1 e PAI-2) (OLIVER *et al.*, 2005). No terceiro trimestre de gestações normotensas, Coolman *et al.* (2006) e Robb *et al.* (2009) demonstraram uma elevação nos níveis plasmáticos de PAI-1 em gestantes, comparando com não gestantes e uma maior inibição da liberação endotelial de t-PA na gravidez, devido ao excesso de PAI-1. Dessa forma, a razão t-PA:PAI-1 estava diminuída nas gestantes, caracterizando um estado pró-trombótico.

Como os níveis de D-Di refletem tanto a formação, quanto a degradação da fibrina (BATES, 2012), os dados obtidos no presente estudo sugerem que a elevação dos níveis de D-Di nas gestantes que desenvolveram PE possa refletir a produção exacerbada de fibrina. Isto caracteriza um estado hipercoagulante, uma vez que o sistema fibrinolítico estaria modulado pelos níveis elevados de PAI-1, também observados nas gestantes que desenvolveram PE.

A razão D-Di/PAI-1 mostrou uma tendência a aumentar ao longo dos três primeiros períodos gestacionais avaliados nas gestantes que desenvolveram PE, confirmando o estado pró-trombótico observado nessa doença (**Tabela 12**). Esse resultado era esperado, sabendo da hipercoagulabilidade associada à PE, inclusive com demonstração de deposição de fibrina no subendotélio de glomérulos renais e na decídua basal das artérias espiraladas nessa doença (BROWN, 1995). Esta tendência ao aumento da razão não foi evidenciada no período de 35-40 semanas, provavelmente porque esse possuía apenas duas gestantes.

Curiosamente, nas gestantes que não desenvolveram PE não foi obtida elevação (ou tendência) da razão D-Di/PAI-1, como seria esperado, sabendo que a gestação normotensa também está associada à hipercoagulabilidade crescente, embora de menor intensidade que na PE. Isso provavelmente resultou da presença de dois *outliers* nos valores obtidos para D-Di no período de 12-19 semanas, que mascarou os resultados, proporcionando uma razão nesse período maior que no período de 20-29 semanas (**Figura 8**). A grande amplitude de valores tanto para D-Di, quanto para PAI-1 no período 35-40 semanas pode ter contribuído para a não obtenção de um valor elevado desta razão, como seria esperado (**Figuras 8 e 12**). No entanto, uma busca criteriosa dos dados clínicos das gestantes que tiveram

valores alterados de D-Di ou PAI-1 poderia apontar uma justificativa para este achado.

## 6.6 Considerações finais

O diagnóstico precoce da PE, antes das manifestações clínicas da doença, é desafiador e a experiência clínica tem mostrado a ocorrência de hipertensão e de sintomas clínicos similares aos da PE (escotoma, cefaleia, epigastralgia, etc), mesmo na ausência de proteinúria. Isto motivou recentemente o *American College of Gynecology and Obstetric* a constituir uma força tarefa, composta por 17 especialistas internacionalmente reconhecidos e com grande experiência clínica em PE a rever os critérios diagnósticos da doença. Esse grupo destacou a importância da redução das plaquetas circulantes, das alterações renal e hepática, bem como da sintomatologia para o diagnóstico da doença, em gestantes apresentando hipertensão como classicamente definida.

Um estudo conduzido por *Lindheimer et al.* em 1975 revelou que a análise de material obtido por biópsia renal caracterizou a presença de outras doenças renais em 20 a 40% dos casos diagnosticados como PE. Da década de 70 até os dias atuais, houve um grande avanço nas metodologias e nos equipamentos para testes laboratoriais, bem como nos equipamentos para exames de imagem. Apesar desse avanço, marcadores eficazes para o diagnóstico da PE ainda não foram definidos.

Considerando a natureza multifatorial da doença, é difícil admitir que um único marcador laboratorial seja suficiente para o seu diagnóstico. O mais provável é que a avaliação de múltiplos marcadores e dos coeficientes de correlação entre esses possam ser eficazes para o diagnóstico precoce da doença. Nesse sentido, os dados obtidos no presente estudo sugerem que os níveis plasmáticos de D-Di e PAI-1 possam vir a fazer parte de um algoritmo diagnóstico a ser aplicado após um score clínico e associado à exames de imagem, como o doppler de artérias uterinas, de forma a contribuir efetivamente para o diagnóstico da PE.

Apesar das dificuldades de condução de estudos envolvendo o acompanhamento de gestantes de risco para PE ao longo da gravidez, o mérito do presente estudo é encorajar novos projetos, criteriosamente elaborados e cercados de medidas para que não haja perda de participantes ao longo do mesmo, de forma a contabilizar um número de gestantes e de amostras de sangue em cada período

gestacional suficientes para permitir, com segurança, a determinação dos *cut-off* de D-Di e PAI-1 para o diagnóstico precoce da doença. A determinação de D-Di indubitavelmente seria de grande valia para o diagnóstico de PE, sabendo que esse teste já está disponível nos laboratórios clínicos.

## 7 CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- Houve uma tendência de aumento dos níveis plasmáticos de D-Di e PAI-1 nas gestantes que desenvolveram e que não desenvolveram PE, ao longo da gestação, e essa tendência foi mais evidente nas que desenvolveram a doença.
- Os níveis plasmáticos de D-Di e PAI-1 não diferiram significativamente comparando as gestantes que desenvolveram PE e as que não desenvolveram a doença, nos períodos gestacionais avaliados.
- Os marcadores plasmáticos D-Di e PAI-1 são candidatos promissores para integrar um algoritmo diagnóstico para a PE, a ser aplicado após um score clínico e em associação à métodos de imagem.

## 8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Constituíram limitações deste estudo:

- O número reduzido de gestantes avaliadas.
- A não obtenção de algumas amostras das gestantes envolvidas no estudo nos períodos gestacionais previstos.
- As dificuldades inerentes ao diagnóstico da PE.
- A ausência de dados clínicos e laboratoriais relevantes de todas as gestantes incluídas no estudo.

## 9 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS

- Elaboração de outro estudo longitudinal, com o mesmo desenho do presente estudo, mas cercado de medidas para que não haja perda de participantes ao longo do mesmo, de forma a contabilizar um número de gestantes e de amostras de sangue em cada período gestacional suficientes para permitir, com segurança, a determinação dos *cut-off* de D-Di e PAI-1 para o diagnóstico precoce da doença.
- Revisão criteriosa dos prontuários clínicos das gestantes envolvidas neste estudo em busca de informações que possam contribuir para justificar os dados obtidos neste estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American College of Obstetricians and Gynecologists; Task Force on hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol*; 122: 1122–1131, 2013.

ADAM, S. S.; KEY, N. S.; GREENBERG, C. S. D-Dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood*, 113(13):2878-2887, 2009.

AKOLEKAR, R.; ZARAGOZA, E.; POON, L. C.; PEPES, S.; NICOLAIDES, K. H. Maternal sérum placental growth factor at 11 + 0 to 13 + 6 weeks of gestation in the prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 32:p.732-739, 2008.

ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Platelet physiology and thrombosis. *Thrombosis Research*, v. 114, n. 5-6, p. 447-453, 2004.

ANGELI, F.; VERDECCHIA, P.; GATTOBIGIO, R.; SARDONE, M.; REBOLDI, G. White-coat hypertension in adults. *Blood Press Monit*, v.10 (6), p.301-305, 2005.

BACHMANN, F. The enigma PAI-2. Gene expression, evolutionary and functional aspects. *Thromb Haemost*, 74:172-9, 1995.

BARTON, J.R.; SIBAI, B.M. Prediction and prevention of recurrent preeclampsia. *Obstet. Gynecol.*112:359–72, 2008.

BATES, S. M. D-Dimer Assays in Diagnosis and Management of Thrombotic and Bleeding Disorders. *Semin Thromb & Hemost*, v. 38, n.7, p. 673-682, 2012.

BELLAMY, L.; CASAS, J. P.; HINGORANI, A. D.; WILLIAMS, D. J. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: a systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 335, p.974-977, 2008.

BELLART, J.; GILABERT, R.; FONTCUBERTA, J.; CARRERAS, E.; MIRALLES, R.M.; CABERO, L. Coagulation and fibrinolysis parameters in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Am J Perinatol*, 15(8):479-86, 1998.

BELO, L.; SILVA, A. S.; RUMLEY, A.; LOWE, G.; LEITE, L. P.; QUINTANILHA, A.; REBELO, I. Elevated tissue plasminogen activator as a potential marker of endothelial dysfunction in pre-eclampsia: correlation with proteinuria. *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. v.109, p.1250-1255, 2002.

BIEZENSKI, J.J.; MOORE, H.C. Fibrinolysis in normal pregnancy. *J Clin Pathol*, 11:306-10, 1958.

BROWN, M. A. The physiology of pre-eclampsia. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. v.22, p.781-791, 1995.

CADROY, Y.; GRANDJEAN, H.; PICHON, J. et al. Evaluation of six markers of haemostatic system in normal pregnancy and pregnancy complicated by hypertension or pre-eclampsia. *Br J ObstetGynaecol*, 100:416-20, 1993.

CARR, D.B.; EPPLEIN, M.; JOHNSON, C.O.; EASTERLING, T.R.; CRITCHLOW, C.W. A sister's risk: family history as a predictor of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 193:965–72, 2005.

CATARINO, C.; REBELO, I.; BELO, L. et al. Relationship between maternal and cord blood hemostatic disturbances in preeclamptic pregnancies. *Thromb Res*, 23(2):219-24, 2008.

CESARMAN-MAUS, G.; HAJJAR, K.A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol*; 129:307-21, 2005.

CETIN, I.; HUPPERTZ, B.; BURTON, G.; CUCKLE, H.; GONEN, R.; LAPAIRE, O.; MANDIA, L.; NICOLAIDES, K.; REDMAN, C.; SOOTHILL, P.; SPENCER, K.; THILAGANATHAN, B.; WILLIAMS, D.; MEIRI, H. Pregenesys pre-eclampsia markers consensus meeting: What do we require from markers, risk assessment and model systems to tailor preventive strategies? *Placenta*, 32, p.4-16, 2011.

CHAPPELL, L.C.; SEED, P.T.; BRILEY, A. et al. A longitudinal study of biochemical variables in women at risk of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 187:127-36, 2002.

CHOI, P. Tissue plasminogen activator levels change with plasma fibrinogen concentrations during pregnancy. *Annals of Hematology*, 81(11):611–615, 2002.

CLARK, P.; WALKER, I.D. The phenomenon known as acquired activated protein C resistance. *Br J Haematol*, v.115, p.767-773, 2001.

COOLMAN, M.; DE GROOT, C. J.; STEEGERS E. A.; GEURTS-MOESPOT, A.; THOMAS, C. M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P.; SWEEP, F. C. Concentrations of plasminogen activators and their inhibitors in blood preconceptionally, during and after pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* v.128, p.22-28, 2006.

COSMI, B.; LEGNANI, C.; TOSETTO, A.; PENGO, V.; GHIRARDUZZI, A.; TESTA, S.; PRISCO, D.; POLI, D.; TRIPODI, A.; MARONGIU, F.; PALARETI, G. Usefulness of repeated D-dimer testing after stopping anticoagulation for a first episode of unprovoked venous thromboembolism: the PROLONG II prospective study. *Blood*, v. 115, n.3, p. 481-488, 2010.

COWANS, N.J.; STAMATOPOLOU, A.; MATWEJEW, E.; VON KAISENBERG 26, C.S.; SPENCER, K. First-trimester placental growth factor as a marker for hypertensive disorders and SGA. *Prenat Diagn.* 30(6):565-70, 2010.

DAVEY, D. A.; MACGILLIVRAY, I. The classification and definition of the hypertensive disorders of pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v. 158, n. 4, p. 892-8, 1988.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*.145:1310-1312, 1964.

DECLERCK P.J.; ALESSI, M.C.; VERSTREKEN, M.; KRUIHOF, E.K.; JUHAN-VAGUES, I.; COLLEN, D. Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood*, 71: 220-225, 1988.

DEKKER, G.A.; DE VRIES, J.I.; DOELITZSCH, P.M.; HUIJGENS, P.C.; VON BLOMBERG, B.M.; JAKOBS, C. et al. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*.173 (4):1042-8,1995.

DUCKITT, K.; HARRINGTON, D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *Br. Med. J.* 330:549–50, 2005.

DUSSE, L. M. S. Avaliação da hemostasia e do óxido nítrico (NO) na doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG). Tese de Doutorado, São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, 1999.

DUSSE, L.; VIEIRA, L.; CARVALHO, M. Avaliação do dímero D (D-Di) na doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG). *J Bras Patol Clin*, 39(3):4, 2003.

ESPLIN, M.S.; FAUSETT, M.B.; FRASER, A.; KERBER, R.; MINEAU, G. et al. Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 344:867–72, 2001.

ESTELLES, A.; GILABERT, J.; AZNAR, J.; LOSKUTOFF, D.J.; SCHLEEF, R.R. Changes in the plasma levels of type 1 and type 2 plasminogen activator inhibitors in normal pregnancy and in patients with severe preeclampsia. *Blood*, 74:1332-8, 1989.

ESTELLES, A. et al. Abnormal expression of type 1 plasminogen activator inhibitor and tissue factor in severe preeclampsia. *Thrombosis and Haemostasis*, v.79, n.3, p.505-508, 1998.

FRANCALANCI, I.; COMEGLIO, P.; LIOTTA, A. A.; CELLAI, A. P.; FEDI, S., PARRETTI, E.; MELLO, G.; PRISCO, D.; ABBATE, R. D-Dimer concentrations during normal pregnancy, as measured by ELISA. *Thrombosis Research*, vol.78, n.5, p.399-405, 1995.

GATTNEY, P. J. Monoclonal antibodies to crosslinked fibrin degradation products (XL-FDP). Evolution in a variety of clinical conditions. *Br. J. Hematol.*, Oxford, v.68, p.91-96, 1988.

GHULMIYYAH, L.; SIBAI, B. "Maternal mortality from preeclampsia/ eclampsia," *Seminars in Perinatology*, vol. 36, no. 1, p. 56–59, 2012.

GIAVARINA, D.; MEZZENA, G.; DORIZZI, R. M.; SOFFIATI, G. Reference intervalo f D-dimer in pregnant women. *Clinical Biochemistry*, v.34, p.331-333, 2001.

GILABERT J. et al. Modificaciones de la hemostasia en obstetricia. Rev. Iberoamer. Tromb. Hemostasia, 8:p.102-112, 1995.

GINSBURG, D.; ZEHEB, R.; YANG, A.Y. et al. cDNA cloning of human plasminogen activator-inhibitor from endothelial cells. J Clin Invest, 78:1673-80, 1986.

GORDIN, D.; HIILESMAA, V.; FAGERUDD, J.; RONNBACK, M.; FORSBLOM, C.; KAAJA, R. et al. Pre-eclampsia but not pregnancy-induced hypertension is a risk factor for diabetic nephropathy in type 1 diabetic women. Diabetologia, 50:516-522, 2007.

GOW, L.; CAMPBELL, D. M.; OGSTON, D. The fibrinolytic system in pre-eclampsia. J. Clin. Pathol., London, v.37, p.56-58, 1964.

GULEC, U. K.; OZGUNEN, F. T.; GUZEL, A. B.; BUYUKKURT, S.; SEYDAOGLU, G.; URUNSAK, I. F.; EVRUKE, I. C. An analysis of C - Reactive protein, procalcitonin, and D-Dimer in Pre-Eclamptic Patients. American Journal of Reproductive Immunology.68:331-337, 2012.

HALE, S. A.;SOBEL, B.;BENVENUTO, A.; SCHONBERG, A.; BADGER, G.J. BERNSTEIN, I.M. Coagulation and Fibrinolytic System Protein Profiles in Women with Normal Pregnancies and Pregnancies Complicated by Hypertension. Pregnancy Hypertens, April 1; 2(2): 152–157, 2012.

HALILOGLU, B.; AKSUNGAR, F. B.; CELIK, A.; ILTER, E.; COKSUER, H.; OZEKICI, U. Negative correlation between D-dimer and homocysteine levels during pregnancy and the postpartum period: a prospective study. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, v.153, p.23-26, 2010.

HALLIGAN, A.; BONNAR, J.; SHEPPARD, B.; DARLING, M.; WALSH, J. Haemostatic, fibrinolytic and endothelial variables in normal pregnancies and pre-eclampsia. Br J ObstetGynaecol, 101:488-92, 1994.

HANSEN, A. T.; ANDREASEN, B. H.; SALVIG, J. D.; HVAS, A. Changes in fibrin D-dimer, fibrinogen, and protein S during pregnancy. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation, v.71, p.173-176, 2011.

HE, S.; BREMME, K.; BLOMBACK, M. Acquired deficiency of antithrombin in association with a hypercoagulable state and impaired function of liver and/or kidney in preeclampsia. Blood Coagul Fibrinolysis, 8(4):232-8, 1997.

HEAZELL, A.E.; BROWN, M.; WORTON, S.A.; DUNN, W.B. Review: The effects of oxygen on normal and pre-eclampsia placental tissue-insights from metabolomics. Placenta. v. 32, p. 30, 2011.

HEILMANN, L.; RATH, W.; POLLW, K. Hemostatic Abnormalities in patients with severe preeclampsia. Clinical and applied Thrombosis/Hemostasis, v. 13, n.3, p.285-291, 2007.

HELLGREN, M. Hemostasis during pregnancy and puerperium. *Haemostasis*, 4:244-7, 1996.

HELLGREN, M. Hemostasis during normal pregnancy and puerperium. *Semin Thromb Hemost*, 29:125-30, 2003.

HIGGINS, J. R.; WALSH, J. J.; DARLING, M. R. N.; NORRIS, L.; BONNAR, J. Hemostasis in the uteroplacental and peripheral circulations in normotensive and pre-eclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. v.179, n.2, p.520-526, 1998.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematology/Oncology Clinics of North American*, v. 21, n. 1, p. 1-11, 2006.

HUI, D.; OKUN, N.; MURPHY, K.; KINGDOM, J.; ULERYK, E. SHAH, P. S. "Combinations of maternal serum markers to predict preeclampsia, small for gestational age, and stillbirth: a systematic review.," *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, vol. 34, no. 2, pp. 142–153, 2012.

HUI, C.; LILI, M.; LIBIN, C.; RUI, Z.; FANG, G.; LING, G.; JIANPING, Z. Changes in coagulation and hemodynamics during pregnancy: a prospective longitudinal study of 58 cases. *Arch Gynecol Obstet*, v.285, p.1231-1236, 2012.

HUNT B. J.; MISSFELDER-LOBOS, H.; PARRA-CORDERO, M.; FLETCHER O.; PARMAR, K.; LEFKOU, E.; LEES C. C. Pregnancy outcome and fibrinolytic, endothelial and coagulation markers in women undergoing uterine artery Doppler screening at 23 weeks. *J Thromb Haemost*, v.7, p.955-961, 2009.

HUPPERTZ, B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension*. 51(4):970-5, 2008.

IMPERATORE, A.; ROLFO, A.; PETRAGLIA, F.; CHALLIS, J.R.; CANIGGIA, I. Hypoxia and preeclampsia: increased expression of urocortin 2 and urocortin 3. *Reproductive sciences*. v. 17, p.833-843, 2010.

JEREMIAH, Z. A.; ADIAS, T. C.; OPIAH, M.; GEORGE, S. P.; MGBERE, O.; ESSIEN, E. J. Elevation in D-dimer concentrations is positively correlated with gestation in normal uncomplicated pregnancy. *International Journal of Women's Health*, v.4, p.437-443, 2012.

JIM, B.; SHARMA, S.; KEBEDE, T.; ACHARYA, A. Hypertension in pregnancy: a comprehensive update. *Cardiol Rev*.18 (4):178-89, 2010.

JOLY, B., BARBAY, V.; BORG, J.; CAM-DUCHEZ, V. L. Comparison of markers of coagulation activation and thrombin generation test in uncomplicated pregnancies. *Thrombosis Research*, v.132, p.386-391, 2013.

JUHAN-VAGUE, I.; MOERMAN, B.; DE COCK, F.; AILLAUD, M.F.; COLLEN, D. Plasma levels of specific inhibition of tissue-type plasminogen activator (and urokinase) in normal and pathological conditions. *Thromb Res*, 33:523, 1984.

KAWAGUCHI, S.; YAMADA, T.; TAKEDA, M.; NISHIDA, R.; YAMADA, T.; MORIKAWA, M.; MINAKAMI, H. Changes in D-dimer levels in pregnant women according to gestational week. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*, v.3, p.172-177, 2013.

KEVORKIAN, J.P.; HALIMI, C.; SEGRESTAA, J.M.; DROUET, L.; SORIA, C. Monitoring of patients with deep-vein thrombosis during and after anticoagulation with D-Dimer. *Lancet*, London. v. 351, p.571-572, 1998.

KHALAFALLAH, A. A.; MORSE, M.; AL-BARZAN, A.; ADAMS, M.; DENNIS, A.; BATES, G.; ROBERTSON, I.; SEATON, D.; BRAIN, T. D-Dimer levels at different stages of pregnancy in Australian women: A single centre study using two different immunoturbidimetric assays. *Thrombosis Research*, v.130, p.171-177, 2012.

KLINE, J. A.; WILLIAMS, G. W.; HERNANDEZ-NINO, J. D-Dimer concentrations in normal pregnancy: new diagnostic thresholds are needed. *Clinical Chemistry*, 51:5, p.825-829, 2005.

KOH, C.L.; VIEGAS, O.A.; YUEN, R.; CHUA, S.E.; NG B.L.; RATNAM, S.S. Plasminogen activators and inhibitors in normal late pregnancy, postpartum and in the postnatal period. *Int J GynaecolObstet*, 38:9–18, 1992.

KOH, S.C.; ANANDAKUMAR, C.; MONTAN, S.; RaATNAM, S.S. Plasminogen activators, plasminogen activator inhibitors and markers of intravascular coagulation in pre-eclampsia. *GynecolObstet Invest*, 35:214-21, 1993.

KRUIHOF, E.K.O.; TRAN-THANG, C.; RANSIJIN, A.; BACHMANN, F. Demonstration of a fast-acting inhibitor of plasminogen activator in plasma. *Blood* 64:907, 1984.

KRUIHOF, E.K.; GUDINCHET, A.; BACHMANN, F. Plasminogen activator inhibitor 1 and plasminogen activator inhibitor 2 in various disease states. *ThrombHaemost*, 59:7–12, 1988.

KRUIHOF, E.K. Plasminogen activator inhibitors—a review. *Enzyme*, 40: 113-21, 1988.

LALA, P.K.; CHAKRABORTY, C. Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury. *Placenta*, 24:575-87, 2003.

LAMBERT-MESSERLIAN, G.M.; PALOMAKI, G.E.; NEVEUX, L.M.; CHIEN, E.; FRIEDMAN, 25. A.; ROSENE-MONTELLA, K. et al. Early onset preeclampsia and second trimester serum markers. *Prenat Diagn*.29 (12):1109-17, 2009.

LINDHEIMER, M. D.; SPARGO, B. H.; KATZ, A. I. Renal biopsy in pregnancy induced hypertension. *Journal of Reproductive Medicine*, v. 15, n. 5, p. 189-94, 1975.

LUNDGREN, C.H.; BROWN, S.L.; NORDT, T.K.; SOBEL, B.E.; FUJII, S. Elaboration of type-1 plasminogen activator inhibitor from adipocytes. A potential pathogenetic link between obesity and cardiovascular disease. *Circulation*, 93:106-10, 1996.

MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. *Nature*.202:498-499, 1964.

MCDONALD, S. D.; MALINOWSKI, A.; ZHOU, Q.; YUSUF, S.; DEVEREAUX, P. J. Cardiovascular sequela of preeclampsia/eclampsia: a systematic review and meta-analyses. *Am Heart J*. 156:p.918-930, 2008.

MENON, I.S.; PEBERDY, M.; RANNIE, G.H.; WEIGHTMAN, D.; DEWAR, H.A. A comparative study of blood fibrinolytic activity in normal women, pregnant women and women on oral contraceptives. *J ObstetGynaecol Br Commonw*, 77:752-6, 1970.

MORESCO, R. N.; SILLA, L. M. R. Aplicação do D-dímero na investigação de distúrbios tromboembólicos. *RBAC*, v. 37(1): 19-21, 2005.

MURPHY, N.; BROADHURST, D. I.; KHASHAN, A. S.; GILLIGAN, O.; KENNY, L. C.; O'DONOGHUE, K. Gestation-specific D-dimer reference ranges: a cross-sectional study. *BJOG*, DOI:10.1111/1471-0528.12855, 2014.

NORRIS, L.A. Blood coagulation. *BestPract Res ClinObstetGynaecol*, Jun; 17(3):369–383, 2003.

NY, T.; SAWDEY, M.; LAWRENCE, D.; MILLAN, J.L.; LOSKUTOFF, D.J. Cloning and sequence of a cDNA coding for the human beta-migrating endothelial-cell-type plasminogen activator inhibitor. *ProcNatlAcadSci U S A*, 83:6776-80, 1986.

[No authors listed]. Report of the National High Blood Pressure. Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*.183 (1):S1-22, 2000.

OGEGEBE, G.; PICKERING, T. G.; CLEMOW, L. et al. The misdiagnosis of hypertension: the role of patient anxiety. *Arch Intern Med*, v.168 (22), p.2459-2465, 2008.

OLIVER, J. J.; WEBB, D. J.; NEWBY, D. E. Stimulated tissue plasminogen activator release as a marker of endothelial function in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. v.25, p.2470-2479, 2005.

O'RIORDAN, M. N.; J.R., H. Haemostasis in normal and abnormal pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v. 17, n. 3, p. 385-396, 2003.

PALARETI, G.; COSMI, B.; LEGNANCI, C.; TOSETTO, A.; BRUSI, C.; LORIO, A. et al. PROLONG Investigators. D-dimer testing to determine the duration of anticoagulation therapy. *N Engl J Med*, 355:1780 –9, 2006.

PARRA, M.; RODRIGO, R.; BARJA, P. et al. Screening test for preeclampsia through assessment of uteroplacental blood flow and biochemical markers of oxidative stress and endothelial dysfunction. *Am J ObstetGynecol*, 193:1486-91, 2005.

PATERNOSTER, D. M.; STELLA, A.; SIMIONI, P.; GIROLAMI, A.; PLEBANI, M. Fibronectin and antithrombin as markers of pre-eclampsia in pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 70:33-39, 1996.

PENNINGTON, K. A.; SCHLITT, J. M.; JACKSON D. L.; SCHULZ, L. C.; SCHUST, D. J. Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. *Dis Model Mech*, 5:p.9-18, 2012.

PINHEIRO, M. B.; JUNQUEIRA, D. R. G.; COELHO, F. F.; FREITAS, L. G.; CARVALHO, M. G.; GOMES, K. B.; DUSSE, L. M. S. D-dimer in preeclampsia: Systematic review and meta-analysis. *Clinica Chimica Acta*, v.414, p.166-170, 2012.

PINHEIRO, M. B.; GOMES, K. B.; DUSSE, L. M. S. Fibrinolytic system in preeclampsia. *Clinica Chimica Acta*, 416, 67-71, 2013.

RAO, A. K.; DANIELS, K.; EL-SAYED, Y. Y.; MOSHESH, M.; CAUGHEY, A.B.; "Perinatal outcomes among Asian American and Pacific Islander women," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 195, no. 3, pp. 834–838, 2006.

RÉGER, B.; PÉTERFALVI, Á.; LITTER, I.; PÓTÓ, L.; MÓZES, R.; TÓTH, O.; KOVÁCS, G. L.; LOSONCSY, H. Challenges in the evaluation of D-dimer and fibrinogen levels in pregnant women. *Thrombosis Research*, v.131, p.183-187, 2013.  
REITH, A.; BOOTH, N.A.; MOORE, N.R.; CRUICKSHANK, D.J.; BENNETT, B. Plasminogen activator inhibitors (PAI-1 and PAI-2) in normal pregnancies, preeclampsia and hydatidiform mole. *Br J Obstet Gynaecol*, 100:370-4, 1993.

ROBB, A. O.; MILLS, N. L.; DIN, J. N.; CAMERON, S.; LUDLAM, C. A.; NEWBY, D. E.; DENISON, F. C. Acute endothelial tissue plasminogen activator release in pregnancy. *J Thromb Haemost*. v.7, p.138-142, 2009.

ROBERTS J.M.; CATOV J.M. Preeclampsia more than 1 disease: or is it? *Hypertension*. v. 51, p. 989-990, 2008.

ROBINSON, C. J.; JOHNSON, D. D.; CHANG, E. Y.; ARMSTRONG D. M.; WANG, W. Evaluation of placenta growth factor and soluble Fms-like tyrosine kinase 1 receptor levels in mild and severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 195:p.255-259, 2006.

ROES, E.M.; SWEEP, C.G.; THOMAS, C.M. et al. Levels of plasminogen activators and their inhibitors in maternal and umbilical cord plasma in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 187:1019-25, 2002.

ROYLE, G.; BARRY, C. L.; BLACKLOCK, H. LAKE, Y. D-Dimers: a poor correlate of PPIH and subsequent outcomes. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v.62, p.37-42, 1998.

SAMAD, F.; YAMAMOTO, K.; LOSKUTOFF, D.J. Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. Induction by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J Clin Invest*, 97:37-46, 1996.

SCAZZIOTA, A.; ALTMAN, R. El mecanismo de la hemostasia normal. Revista Iberoamericana de Trombosis y Hemostasia, v.1, p. 9 -26, 1996.

SCHJETLEIN, R.; HAUGEN, G.; WISLOFF, F. Markers of intravascular coagulation and fibrinolysis in preeclampsia: association with intrauterine growth retardation. Acta Obstet Gynecol Scand, 76(6):541-6, 1997.

SCHJETLEIN, R.; ABDELNOOR, M.; HAUGEN, G.; HUSBY, H.; SANDSET, P.M.; WISLOFF, F. Hemostatic variables as independent predictors for fetal growth retardation in preeclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand, 78:191-7, 1999.

SCHLEEF, R.R.; SINHA, M.; LOSKUTOFF, D.J. Immunoradiometric assay to measure the binding of a specific inhibitor to tissue-type plasminogen activator. J Lab Clin Med, 106:408, 1985.

SCHUILING, G.A.; KOITER, T.R.; FAAS, M.M. Why pre-eclampsia? Hum Reprod. V.12, p.2087-2091, 1997.

SHAPER, A.G.; MACINTOSH, D.M.; EVANS, C.M.; KYOBE, J. Fibrinolysis and plasminogen levels in pregnancy and the puerperium. Lancet, 2:706-8, 1965.

SIBAI, B. M.; GORDON, T.; THOM, E.; CARITIS, S. N.; KLEBANOFF, M.; MCNELLIS, D.; PAUL, R. H. Risk factors for preeclampsia in healthy nulliparous women: A prospective multicenter study. American Journal of Obstetrics and Gynecology, v.172, p.642-648, 1995.

SIBAI, B.; DEKKER, G.; KUPFERMINC, M. Pre-eclampsia. *Lancet* 365:785–99, 2005.

SIBAI, B.M. Maternal and uteroplacental hemodynamics for the 27. Classification and prediction of preeclampsia. Hypertension. 52(5):805-6, 2008.

SMITH, S. A. The cell-based model of coagulation. Journal of veterinary emergency and critical care, v. 19, n. 1, p. 3-10, 2009.

STAFF, A.C.; DECHEND, R.; PIJNENBORG, R. Learning from the placenta: acute atherosclerosis and vascular remodeling in preeclampsia- novel aspects for atherosclerosis and future cardiovascular health. Hypertension. v. 56, p. 1026-1034, 2010.

SUCAK, G. T.; ACAR, K.; SUCAK A.; KIRAZLI, S.; HAZNEDAR, R. Increased global fibrinolytic capacity as a clue for activated fibrinolysis in pre-eclampsia, Blood Coagulation and Fibrinolysis, 17:347–352, 2006.

SYROVETS, T.; Lunov, O.; Simmet, T. Plasmin as a proinflammatory cell activator. J Leukoc Biol 92:509–519, 2012.

TANJUNG, M.T. Coagulation and fibrinolysis in preeclampsia and neonates. ClinApplThrombHemost, 11:467-73, 2005.

TERAO, T.; MAKI, M.; IKENOUE, T. et al. The relationship between clinical signs and hypercoagulable state in toxemia of pregnancy. *Gynecol Obstet Invest*, 31(2): 74-85, 1991.

THORSEN, S.; PHILIP, M. Isolation of tissue-type plasminogen activator-inhibitor complexes from human plasma. Evidence for a rapid plasminogen activator inhibitor. *BiochimBiophysActa*, 802:111, 1984.

TUBBERGEN, P.; LACHMEIJER, A.M.; ALTHUISIUS, S.M.; VLAK, M.E.; VAN GEIJN, H.P.; DEKKER, G.A. Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparous women? *J. Reprod. Immunol.*45: 81–88, 1999.

URDÉN, G.; CHMIELEWSKA, J.; COULSSON, T.; WIMAN, B. Immunological relationship between plasminogen activator inhibitors from different sources. *ThrombHaemost*, 57:29, 1987.

UZAN, J.; CARBONNEL, M.; PICONNE, O.; ASMAR, R.; AYOUBI, J.M. Preeclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vasc Health Risk Manag.* v. 7, p. 467-474, 2011.

VAUGHAN, D.E. PAI-1 and atherothrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis.* v.3, p. 1897-1883, 2005.

VENKATESHA, S.; TOPORSIAN, M.; LAM, C. "Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia," *Nature Medicine*, vol. 12, no. 6, pp. 642–649, 2006.

VERHEIJEN, J.H.; CHANG, G.T.G.; KLUFT, C. Evidence for the occurrence of a fast-acting inhibitor for tissue-type plasminogen activator in human plasma. *ThrombHaemost*, 51:392, 1984.

VERLOHREN, S.; GALINDO, A.; SCHLEMBACH, D.; ZEISLER, H.; HERRAIZ, I.; MOERTI, M. G. et al. An automated method for the determination of the s-FIt-1/PIGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 202:161, 2010.

VERSTEEG, H. H.; HEEMSKERK, J. W. M.; LEVI, M.; REITSMA, P. H. New fundamentals in hemostasis. *American Physiological Rev*, vol.93, p.327-358, 2013.

VON DADELSZEN, P.; MAGEE, L.A.; ROBERTS, J.M. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 22(2):143-8, 2003.

WANG, M.; LU, S.; LI, S.; SHEN, F. Reference intervals of D-dimer during the pregnancy and puerperium period on the STA-R evolution coagulation analyser. *Clinica Chimica Acta*, v.425, p.176-180, 2013.

WIKSTROM, A. K.; LARSSON, A.; ERIKSSON, U. J.; NASH, P.; NORDEN-LINDEBERG, S.; OLOVSSON, M. Placental growth factor and soluble FMS-lyke tyrosine kinase-1 in early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 109:p.1368-1374, 2007.

WIKSTROM, A.K.; NASH, P.; ERIKSSON, U.J.; OLOVSSON, M.H. Evidence of increased oxidative stress and a change in the plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 to PAI-2 ratio in early-onset but not late-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 201(597):e591-8, 2009.

XIONG, Y.; ZHOU, S.; ZHOU, R.; YANG, D.; XU, Z.; LOU, Y.; GUO, Q.; HU, R.; PENG, T.; MA, D.; LI, X. Alternations of maternal and cord plasma hemostasis in preeclampsia before and after delivery. *Hypertension in Pregnancy*, 30:347-358, 2011.

YIN, K.H.; KOH, S.C.; MALCUS, P. et al. Preeclampsia: haemostatic status and the short-term effects of methyldopa and isradipine therapy. *J Obstet Gynaecol Res*, 24:231-8, 1998.

**ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais**



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

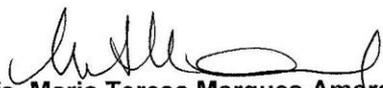
**Parecer nº. ETIC 0618.0.203.000-10**

**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.

  
**Profa. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG**