

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

**AVALIAÇÃO DO VALOR PREDITIVO DO PIGF E
sFit-1 E DO DOPPLER DAS ARTÉRIAS UTERINAS
NO RASTREAMENTO DA PRÉ-ECLÂMPSIA**

PATRÍCIA GONÇALVES TEIXEIRA

Belo Horizonte-MG
2011

PATRÍCIA GONÇALVES TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DO VALOR PREDITIVO DO PIGF E
sFit-1 E DO DOPPLER DAS ARTÉRIAS UTERINAS
NO RASTREAMENTO DA PRÉ-ECLÂMPسيا**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação da Saúde da Mulher da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Perinatologia.

Orientador: Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral.

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina da UFMG
2011

T266a Teixeira, Patrícia Gonçalves.
Avaliação do valor preditivo do PIGF e sFlt-1 e do doppler das artérias uterinas no rastreamento da pré-eclâmpsia [manuscrito]. / Patrícia Gonçalves Teixeira. - - Belo Horizonte: 2011.
119f.: il.
Orientador: Antonio Carlos Vieira Cabral.
Área de concentração: Saúde da Mulher.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Pré-Eclâmpsia. 2. Inibidores da Angiogênese. 3. Placenta. 4. Valor Preditivo dos Testes. 5. Estudos Transversais. 6. Previsões. 7. Dissertações Acadêmicas. I. Cabral, Antonio Carlos Vieira. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WQ 215

Aos meus filhos,
Ana Maura e Eduardo;
e ao James,
meus amores.

A todos aqueles
que de certa forma colaboraram
para a realização deste estudo.

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos serão eternos. Não há marcas definidas no tempo do início de um trabalho, que começa com um sonho inerentemente humano de conquistar novos horizontes e que se torna realidade na medida em que as pessoas participam direta ou indiretamente dele. Agradeço também àqueles que não se opuseram, tornando o caminho mais leve.

Ao meu orientador, Professor Antônio Carlos Vieira Cabral, modelo de professor e pesquisador, que com seu conhecimento amplo do mundo das Ciências Médicas me ajudou a montar este projeto e dar continuidade, com paciência e credibilidade.

Em especial à querida Prof^a Zilma Silveira Nogueira Reis, pelo trabalho técnico de excelência e muito mais pelo crescimento pessoal. Agradeço por me ensinar a olhar de maneira positiva “as coisas” da vida, pelo otimismo, amizade e companheirismo e incentivo em divulgar os resultados deste estudo em congressos nacionais e internacionais, colocando realidade em sonhos tão ousados.

Agradeço a “porta aberta” e o acolhimento carinhoso de todos que formam o grupo Centro de Medicina Fetal (CEMEFE) e da Maternidade do Hospital das Clínicas e à Prof^a Sílvia Passos de Andrade, por ceder conhecimentos em angiogênese.

Obrigada, Monaliza Angela Rocha, pelas análises técnicas laboratoriais feitas com tanta precisão. Parte essencial deste trabalho dependeu diretamente da sua competência ao realizar os ensaios de ELISA.

À Maria de Lourdes Drummond, nessa empreitada existencial, sem mais palavras; e ela sabe por quê...

A Ana Maura e Eduardo Julião, amores da minha vida, que aceitaram minha ausência materna com todo o seu significado, peço desculpas pelas perdas e excessos ao tentar compensá-las.

Agradeço de todo o coração às gestantes que voluntariamente foram sujeitos desta pesquisa, modelos da prática obstétrica e de vida.

Às acadêmicas da iniciação científica, Christy e Gabi, pela dedicação ao trabalho e interesse em realizá-lo com alegria e por acolher as gestantes com tanto carinho.

Esta tese faz parte de um trabalho em equipe e sozinha seria impossível realizá-la.

FINANCIAMENTO DA PESQUISA

A viabilização desta pesquisa contou com o apoio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), a partir do projeto 9.671, além de recursos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), geridos pelo Programa da Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

O Laboratório de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas cedeu material de coleta, processamento, armazenagem e, principalmente, apoio técnico e científico.

Os exames ultrassonográficos obstétricos e a análise do doppler das artérias uterinas foram realizados no Hospital das Clínicas da UFMG.

No Laboratório de Angiogênese do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG foram realizadas as dosagens dos fatores de angiogênese.

RESUMO

Introdução: o objetivo deste estudo transversal foi investigar o valor do fator de crescimento placentário (PIGF), do fator solúvel fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1), da relação sFlt-1/PIGF e da incisura bilateral (IB) como biomarcadores de pré-eclâmpsia (PE) no segundo trimestre da gravidez. **Métodos:** trata-se de estudo transversal realizado em 71 gestantes de risco de PE a partir de 23 semanas de gestação. O doppler de artérias uterinas foi realizado em todas as gestantes e amostra de plasma foi armazenada a -80 graus. A definição de PE seguiu os critérios da NHBPEPWG, 2000. Receiver-operating characteristics (ROC) e a área sob a curva (AUC) foram calculadas para determinar a acurácia global do doppler das artérias uterinas e dos fatores de angiogênese (PIGF, sFlt-1 e relação sFlt-1/PIGF) na predição de PE. O benefício da associação em série e em paralelo desses biomarcadores foi analisado nesta coorte. **Resultados:** a sensibilidade da incisura bilateral nas artérias uterinas como marcador de PE foi de 58,8% e o valor preditivo negativo de 91,7%. A área sob a curva ROC para o PIGF, sFlt-1, a relação sFlt-1/PIGF e a IB foram 0,90, 0,80, 0,95 e 0,75, respectivamente. O melhor ponto de corte para PIGF, sFlt-1 e sFlt-1/PIGF (159,5 pg/mL, 927,06 pg/mL e $\geq 4,9$) foi determinado pela maior sensibilidade na curva ROC. **Conclusão:** os fatores de angiogênese PIGF, sFlt-1 e a relação sFlt-1/PIGF são eficientes biomarcadores de pré-eclâmpsia e a associação entre eles melhorou o valor preditivo positivo dessa doença.

Palavras-chave: Angiogênese. Predição. Pré-eclâmpsia. Incisura bilateral.

ABSTRACT

Introduction: The aim of this sectional study was investigate the value of placental growth factor (PlGF), soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) and sFlt-1/PlGF ratio and bilateral notching (IB), in second trimester of pregnancy has useful to markers preeclampsia (PE). **Methods:** A cross-section study was carried out on 71 pregnancies at risk of PE from 23 weeks gestation. All the women had uterine arteries doppler analysis and plasma was stored at -80 degrees. PE was defined according to the NHBPEPWG, 2000. Receiver-operating characteristics (ROC) and the area under the curve (AUC) was calculated to compare the overall accuracy of artery uterine doppler and maternal plasma concentrations of PlGF and sFlt-1/PlGF ratio to predicts PE. The benefit of the combination in series and in parallel of these biomarkers was analyzed in this cohort. **Results:** Bilateral notch in artery uterine doppler predicts PE with sensibility values 58.8% and negative predict values 91.7%. PlGF, sFlt-1, sFlt-1/PlGF ratio and IB area under the curve was 0.90, 0.80, 0.95 and 0.75 respectively. The best cutoff for PlGF, sFlt-1 and the sFlt-1/PlGF ratio (159.5 pg / ml, 927.06 pg / ml and ≥ 4.9) was determined by the highest sensitivity in the ROC curve. **Conclusion:** Angiogenesis factors PlGF, sFlt-1 and the sFlt-1/PlGF ratio were effective biomarkers in predicting preeclampsia and more importantly, the association of bilateral notch with them, improved the positive predictive values of this disease.

Key Words: Angiogenesis. Prediction. Preeclampsia. Bilateral notching.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang	Angiopoetina
AT1	Autoanticorpos antagonistas do receptor tipo1 da angiotensina II
AUC	Área sob a curva ROC
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEMEFE	Centro de Medicina Fetal
CIUR	Crescimento intrauterino restrito
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOPPLER	Dopplervelocimetria
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme Linked Imunosorbent Assay
FAPEMIG	Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HELLP	Hemolysis, elevated enzymes liver, low platelets count
IB	Incisura bilateral
IC	Intervalo de confiança
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IgG	Imunoglobulina G
IP	Índice de pulsatilidade
IR	Índice de resistência
KCl	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Hidrogenofosfato de potássio
LR	Likelihood ratio
Na_2HPO_4	Fosfato disodium do hidrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
NHBPEPWG	National High Blood Pressure Education Programs Working Group

NK	Natural killer
OPD	O-fenilenodiamina hidrocloreídrico
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Phosphate buffered saline
PD	Pressão diastólica
PE	Pré-eclâmpsia
PIGF	Fator de crescimento placentário
PNAR	Pan-American Resources
PO ₂	Pressão de oxigênio
PP13	Proteína 13 placentária
PS	Pressão sistólica
RN	Recém-nascido
ROC	Receiver-operating characteristics
sEng	Soluble Endoglin
sFlt1	Soluble Fms-like receptor tirosina quinase
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TGF-beta	Transforming growth factor beta
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VPP	Valor preditivo positivo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

FIGURA 1 Placentação anormal na pré-eclâmpsia.....	26
FIGURA 2 Representação esquemática da produção e liberação placentária dos fatores de angiogênese pela placenta na gestação normal e na gestação com pré-eclâmpsia.....	29
FIGURA 3 Fisiologia da pré-eclâmpsia.....	32
FIGURA 4 Representação da variação média entre sístole e diástole das artérias uterinas durante o ciclo menstrual, no primeiro, segundo e terceiro trimestres da gravidez.....	35
FIGURA 5 Doppler de artéria uterina mostrando baixa resistência no fluxo diastólico e ausência de incisura, características de condições fisiológicas.....	36
FIGURA 6 Parâmetros do espectro da onda uterina e índices doppler.....	38
FIGURA 7 Diagrama numérico das gestantes da coorte e subdivisão que formaram os grupos A e B.....	51

Gráficos

GRÁFICO 1 Representação por caixas do PIGF (pg/mL) nas gestantes normotensas(0) e nas hipertensas crônicas(1).....	69
GRÁFICO 2 Representação por caixas do sFlt-1 (pg/mL) nas gestantes dos grupos A e B no segundo trimestre da gravidez.....	70
GRÁFICO 3 Representação por caixas da relação sFlt-1/PIGF nas gestantes dos grupos A e B.....	71
GRÁFICO 4 Representação por caixas da concentração do PIGF (pg/mL) no segundo trimestre da gravidez, nos grupos de gestantes que se formaram no final da gravidez.....	72
GRÁFICO 5 Representação por caixas das concentrações do sFlt-1	

(pg/mL) no segundo trimestre em relação ao evento final da gravidez....	73
GRÁFICO 6 Representação por caixas da relação sFlt-1/PIGF no segundo trimestre em relação aos eventos clínicos no final da gravidez.....	74
GRÁFICO 7 Dosagem sérica do PIGF (pg/mL) nos subgrupos de gestantes com PE.....	75
GRÁFICO 8 Dosagem sérica do sFlt-1 na pré-eclâmpsia dos grupos A e B.	76
GRÁFICO 9 Cálculo da relação dentre o sFlt-1 pelo PIGF na pré-eclâmpsia de origem dos grupos A e B.....	77
GRÁFICO 10 Curvas ROC do PIGF, sFlt-1 e da relação sFlt-1/PIGF.....	78
GRÁFICO 11 Curva ROC sFlt-1/PIGF.....	79
GRÁFICO 12 Curva ROC doppler X relação sFlt-1/PIGF.....	80
GRÁFICO 13 Representação por caixas da concentração do PIGF (pg/mL) no segundo trimestre da gravidez, nos grupos de gestantes que se formaram no final do estudo.....	117
GRÁFICO 14 Representação por caixas das concentrações do sFlt-1 (pg/mL) no segundo trimestre em relação ao evento final da gravidez....	118
GRÁFICO 15 Representação por caixas da relação sFlt-1/PIGF no segundo trimestre em relação aos eventos clínicos no final da gravidez.	119

Quadro

QUADRO 1 Classificação dos estados hipertensivos na gravidez.....	60
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Fatores de angiogênese na predição de pré-eclâmpsia	45
TABELA 2 Características comparativas entre as gestantes dos grupos A e B.....	52
TABELA 3 Dados clínicos das pacientes e dos recém-nascidos no final da gravidez.....	66
TABELA 4 Distribuição das pacientes dos grupos A e B conforme resultado do doppler das artérias uterinas.....	67
TABELA 5 Resultado do exame do doppler das artérias uterinas ao final da gravidez.....	68
TABELA 6 Descrição das áreas sob as curvas ROC para os fatores de angiogênese e o doppler das artérias uterinas.....	81
TABELA 7 Teste da acuidade do doppler das artérias uterinas e dos fatores de angiogênese na predição de pré-eclâmpsia.....	81
TABELA 8 Teste em paralelo da acuidade do doppler e dos fatores de angiogênese na predição de pré-eclâmpsia.....	82
TABELA 9 Teste em série da acuidade do doppler e dos fatores de angiogênese na predição de pré-eclâmpsia.....	83

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 Desenvolvimento placentário fisiológico.....	21
2.1.2 Reguladores da angiogênese placentária.....	21
2.2 Fatores de angiogênese na fisiopatologia da pré-eclâmpsia.....	23
2.2.1 Autoanticorpos antagonistas do receptor tipo 1 (AT1) da angiotensina	30
II.	
2.2.2 As células natural killer.....	30
2.2.3 O estresse oxidativo placentário.....	31
2.3 Biomarcadores de pré-eclâmpsia.....	33
2.3.1 Marcador biofísico.....	34
2.3.1.1 Doppler de artérias uterinas.....	34
2.3.1.2 Índices do doppler das artérias uterinas.....	36
2.3.1.3 Doppler das artérias uterinas nas gestantes hipertensas crônicas....	40
2.3.2 Marcador bioquímico.....	41
2.3.2.1 VEGF, PIGF e sFlt-1 na predição de pré-eclâmpsia.....	41
2.4 Aspectos atuais da predição da pré-eclâmpsia.....	46
2.5 Relação do doppler com os fatores de angiogênese na predição de pré- eclâmpsia.....	46
3 OBJETIVO.....	49
4 PACIENTES E MÉTODOS.....	50
4.1 Pacientes.....	50
4.1.1 Critério de exclusão.....	51
4.1.2 Caracterização das gestantes do grupo A.....	52

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009.

4.1.3 Caracterização das gestantes do grupo B.....	53
4.2 Métodos.....	53
4.2.1 Técnica do exame de dopplervelocimetria das artérias uterinas.....	53
4.2.2 Coleta de sangue.....	53
4.2.3 Dosagem do fator de angiogênese (PIGF e sFlt-1).....	54
4.2.4 Técnica de dosagem.....	55
4.2.5 Dosagem do fator de crescimento placentário PIGF e do sFlt-1.....	55
4.2.5.1 Sensibilização da placa de ELISA para detecção de PIGF.....	56
4.2.5.2 Segunda etapa do ensaio para detecção de PIGF: bloqueio.....	57
4.2.5.3 Terceira etapa do ensaio: detecção e revelação.....	57
4.2.6 Diagnóstico de pré-eclâmpsia.....	58
4.2.7 Medida da pressão arterial.....	58
4.2.8 Mensuração da proteinúria.....	59
4.2.9 Análise dos fatores de angiogênese e do doppler das artérias uterinas	60
4.2.9.1 Análise da concentração dos fatores de angiogênese nas gestantes dos grupos A e B e na predição dos subgrupos formados.....	61
4.2.9.2 Análise da persistência de incisura bilateral e na predição dos subgrupos formados.....	61
4.2.10 Curvas ROC.....	62
4.2.11 Determinação do <i>cutoff</i> para o PIGF, sFlt-1 e relação sFlt-1/PIGF.....	62
4.3 Análise estatística.....	63
4.3.1 Cálculo amostral.....	63
4.3.2 Análise das variáveis.....	63
4.3.3 Método para determinação de AUC.....	64
4.3.4 Cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo.....	64
5 RESULTADOS.....	65
5.1 Doppler das artérias uterinas.....	67
5.2 Representação gráfica das concentrações dos fatores de angiogênese no segundo trimestre da gravidez.....	69
5.2.1 Concentração sérica materna do PIGF nos grupos A e B.....	69

5.2.2 Dosagem sérica materna do receptor solúvel tirosina quinase(sFlt-1) nos grupos A e B.....	70
5.2.3 Caixas da relação sFlt-1/PlGF nos grupos A e B.....	71
5.2.4 Representações gráficas das concentrações dos fatores de angiogênese no segundo trimestre da gravidez em relação aos eventos encontrados no final do estudo.....	72
5.2.5 Análise dos fatores de angiogênese quanto à origem da pré-eclâmpsia.....	75
5.2.6 Tabelas da acuidade do doppler e dos fatores de angiogênese em prever pré-eclâmpsia.....	81
6 DISCUSSÃO.....	84
7 CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS.....	101
ANEXO E APÊNDICES.....	115

1 INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma doença do endotélio vascular, que se manifesta com elevação da pressão arterial e presença de proteinúria após 20 semanas de gravidez e frequentemente complica o ciclo gravídico puerperal. O risco de complicações obstétricas graves, quando se verifica a pré-eclâmpsia, é até 25 vezes mais alto, sobretudo diante de fatores de risco materno (DUCKITT; HARRINGTON, 2005; KHAN; WOJDYLA, SAY, 2006).

A pré-eclâmpsia (PE) se torna mais importante em países subdesenvolvidos, onde a qualidade da assistência à gestante contribui para elevadas taxas de morbidade e mortalidade materna (BRASIL, 2007). A mortalidade fetal também é alta e a prematuridade decorrente da interrupção terapêutica precoce da gravidez eleva a morbidade, em curto e longo prazos, além dos gastos em saúde (ABDALLA; HARRINGTON, 2005; SIBAI; DEKKER; KUPLERMINEC, 2005). A PE tem sido referida na gênese de doenças cardiovasculares e renais, na vida adulta de mulheres que vivenciaram esse quadro clínico e de recém-nascidos com restrição de crescimento intrauterino (BELLAMY; CASA; HINORANI, 2007; RAY *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2009; VIKSE *et al.*, 2008).

A prevalência de pré-eclâmpsia se mantém invariável provavelmente pelas incertezas que cercam sua etiologia. Em geral, acomete 5 a 7% das gestantes (ROBERTS; LAIN, 2002; SIBAI; DEKKER; KUPLERMINEC, 2005). Parece ser uma doença multifatorial cujos mecanismos etiológicos envolvem fatores genéticos, estresse oxidativo, resposta imune inadequada, o sistema renina angiotensina, o ambiente placentário, exagerada resposta inflamatória materna e disfunção do endotélio vascular (LI *et al.*, 2005; REDMAN; SARGENT, 2003; ROBERTS *et al.*, 1989; ROBERTS; LAIN, 2002; SHAN, 2005; SIBAI; DEKKER; KUPLERMINEC, 2005; WANG; RANA; KARUMANCHI, 2008).

Há evidências da circulação de micropartículas e debris de sinciciotrofoblasto na circulação materna em gestantes com pré-eclâmpsia e esses fragmentos são pró-

inflamatórios (SARGENT; GERMAIN; SACKS, 2003). A época do aparecimento da PE durante a gravidez, se antes ou após 34 semanas cronológicas, classifica a doença em precoce e tardia. O prognóstico da gravidez em geral é pior na forma precoce, em relação à forma leve e tardia. Nem sempre o acometimento fetal é concomitante ao materno (SIBAI; DEKKER; KUPLERMINC, 2005; VON DADELSZEN; MAGEE; ROBERTS, 2003).

É provável que a pré-eclâmpsia seja mais de uma doença com mecanismos fisiopatológicos distintos. A forma precoce representa 5 a 20% dos casos, é geralmente mais grave e se relaciona à falha do trofoblasto em remodelar a vasculatura uterina. A forma tardia, geralmente leve, representa mais de 80% dos casos, acomete principalmente as primigestas e acredita-se ser induzida pela produção de fatores placentários (SIBAI; DEKKER; KUPLERMINC, 2005; VON DADELSZEN; MAGEE; ROBERTS, 2003). É indiscutível atribuir à placenta o papel central na gênese da pré-eclâmpsia (KHONG *et al.*, 1986). O tratamento definitivo dessa síndrome hipertensiva é a retirada completa desse tecido. O desenvolvimento do leito vascular placentário, a invasão trofoblástica e a remodelação da vasculatura uterina são fenômenos fisiológicos esperados para aumentar o fluxo sanguíneo local e propiciar o desenvolvimento da placenta e do feto (BRONSENS; ROBERTSON; DIXON, 1967; PIJNENBORG *et al.*, 1983). A falha em estabelecer o leito vascular de baixa complacência é refletida no doppler das artérias uterinas, que mostram aumento da impedância ao fluxo, alta resistência e persistência de incisura diastólica no perfil da onda (CAMPBELL BEWLEY; COHEN-OVERBROOK, 1987). O doppler das artérias uterinas alterado marca a falha da invasão trofoblástica e risco de complicações na gravidez (KAUFMANN; BLACK; HUPPERTZ, 2003; LIN *et al.*, 1995; PAPAGEORGHIU *et al.*, 2005). Na prática clínica, as mudanças nessas artérias vêm sendo investigadas como *screening* de complicações no primeiro, segundo e terceiro trimestres da gravidez (GOMEZ *et al.*, 2006; MELCHIORRE *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 1996; POON *et al.*, 2009). A metodologia usada para a análise dos índices da onda do doppler das artérias uterinas varia entre os autores e há dúvidas quanto à sua utilidade como *screening*, embora haja indícios de que a predição seja

melhor para formas graves e precoce da PE (CONDE-AGUDELO; VILLAR; LINDHEIMER, 2004; PAPAGEORGHIU *et al.*, 2001).

Parece haver benefício da associação do doppler com marcadores bioquímicos placentários na predição de PE (CRISPI *et al.*, 2008; POON *et al.*, 2009; SAVVIDOU *et al.*, 2008). A placenta é órgão endócrino produtor de citocinas, e as envolvidas na angiogênese e vasculogênese, estão presentes no sangue e urina das gestantes, antecedendo cinco a 11 semanas o diagnóstico da pré-eclâmpsia (BUJOLD *et al.*, 2005; LEVINE *et al.*, 2004; WIDMER *et al.*, 2007). Postula-se que o balanço alterado entre substâncias pró-angiogênicas - fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fator de crescimento placentário (PIGF) - e antiangiogênicas - *soluble Fms-like receptor tirosina quinase* (sFlt-1) e *soluble Endoglin* (sEng) - altere os eventos vasculares placentários (LEVINE *et al.*, 2006b; ZHOU *et al.*, 2002). Essas substâncias angiogênicas, secretadas pela placenta na circulação sistêmica materna desencadeiam mudanças endoteliais semelhantes às encontradas na pré-eclâmpsia (SVEDAS *et al.*, 2003; TSATSARIS *et al.*, 2003; WANG; RANA; KARUMANCHI, 2008).

Hipertensão, proteinúria e endoteliose glomerular foram induzidas em animais ao injetar adenovírus com fragmentos de sFlt-1 (MAYNARD *et al.*, 2003). Resposta semelhante foi obtida com níveis séricos de sEng, potencializada pela associação com o sFlt-1 (LEVINE *et al.*, 2006b). Por outro lado, a infusão de anti-VEGF, o VEGF121, cuja ação bloqueia o sFlt-1, reverteu quadro de hipertensão e proteinúria induzido por sFlt-1 em animais de laboratório (JEFFREY *et al.*, 2010). No entanto, a ação biológica desses agonistas/antagonistas da angiogênese estão sob investigação na gênese da PE (KARUMANCHI; EPSETEIN, 2007).

Na busca por preditores precoce e marcadores de gravidade da pré-eclâmpsia, que possam ser de valor em programas de saúde, os fatores de angiogênese isolados ou associados ao doppler de artérias uterinas poderiam ser de grande importância. Assim, esses biomarcadores, como o PIGF, sFlt-1, e o doppler das artérias uterinas foram analisados no pré-natal de gestantes normotensas e hipertensas crônicas do Hospital das Clínicas, como o objetivo de melhorar a

acuidade preditiva quanto ao risco de desenvolvimento de PE durante o prenatal, a partir do segundo trimestre da gravidez.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Desenvolvimento placentário fisiológico

A placenta é órgão altamente vascularizado cuja função é estabelecer uma unidade eficiente de trocas entre mãe e feto e manter a gravidez. As etapas fundamentais na formação placentária são a invasão trofoblástica decidual; a vascularização do trofoblasto; e remodelação das arteríolas espiraladas miometriais, todas dependentes de vasculogênese e angiogênese (LASH *et al.*, 2000). Falhas nessas etapas estão relacionadas a insucesso na gravidez, como perda precoce, pré-eclâmpsia e/ou restrição de crescimento fetal (FISHER; McMASTER; ROBERTS, 2009; KINGDOM *et al.*, 2000) - (FIG. 1).

O surgimento de uma rede vascular é primordial na gênese da placenta e ocorre por mecanismos distintos e sequenciais de vasculogênese e angiogênese. Vasos sanguíneos são evidentes entre o 21^o e o 22^o dias após a concepção, quando células mesenquimais se diferenciam em endoteliais. Em seguida, a neoformação vascular continua através de ramificações que predominam no primeiro e segundo trimestres da gravidez. O enovelamento e alongamento dos vasos prevalecem no final da gravidez (FLAMME; FROLICH; RISAU, 1997; GEVA *et al.*, 2002; SHERER; ADULAFIA, 2001).

2.1.2 Reguladores da angiogênese placentária

Angiogênese placentária está sob influência da pressão de oxigênio tecidual, que muda ao longo da gravidez (AHMED *et al.*, 2000). A “hipóxia relativa” inicial da parede uterina estimula a invasão trofoblástica e a neoformação vascular. Culturas de tecido trofoblástico em diferentes tensões de oxigênio (hipóxia, normóxia e hiperóxia) mostram movimento diferenciado do trofoblasto quanto à migração, proliferação e produção diferenciada dos fatores de angiogênese e

expressão de seus receptores (FIEDLER *et al.*, 2005; JAUNIAUX; WATSON; BURTON, 2001; KARUMANCHI; EPSTEIN 2007; LI *et al.*, 2005).

A família do VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D) e as angiopoetinas (Ang 1 e 2) agem de forma sinérgica, promovendo angiogênese, e são específicas das células endoteliais. As angiopoetinas (Ang1 e Ang2) estão envolvidas nas etapas de formação, remodelação e estabilidade do plexo capilar primário e também na sobrevivência das células endoteliais durante a vasculogênese. Expressam suas atividades pela ligação aos receptores tirosina-quinase (Tie-1 e Tie-2) das células endoteliais e hemangiopoéticas (DUNK *et al.*, 2000; FERRARA; GERBER; LECOUNTER, 2003; ZHOU *et al.*, 2003).

O VEGF-A é um potente agente mitogênico e vasodilatador em situações de hipóxia tecidual (ZHOU *et al.*, 2002). Sua ação envolve os receptores Flt-1 (VEGFR-1) e KDR, que são expressos no trofoblasto durante a invasão dos vasos maternos e remodelação vascular (HELKSKE *et al.*, 2001 ZHOU *et al.*, 2002). O VEGF pode ser detectado no plasma materno na sexta semana de gravidez, com pico de concentração no final do primeiro trimestre (EVANS *et al.*, 1998).

Homólogo do VEGF, o PlGF foi o primeiro fator encontrado em grande quantidade na placenta humana. Induz angiogênese ao ligar-se ao receptor de membrana Flt-1, KDR e VEGFR-2 das células endoteliais, resultando no alongamento e enovelamento dos vasos pré-formados (TAYLOR *et al.*, 2003; WELCH *et al.*, 2006; ZYGMUNT; HERR, 2003). Culturas de trofoblasto *in vitro* mostram que PlGF e VEGF-C e seus receptores, Flt-1 e Flt3, são expressos nas células do trofoblasto e podem contribuir no processo de invasão e diferenciação celular (ZHOU *et al.*, 2003). O PlGF tem sua concentração gradativamente aumentada no sangue materno, com pico entre 28 e 32 semanas de gravidez, quando há aumento do nível de oxigênio local (LEVINE *et al.*, 2004; NOORI *et al.*, 2010).

Uma variante do Flt-1, o receptor solúvel tirosina quinase (sFlt-1), encontra-se na forma livre e age como antagonista da angiogênese ao ligar-se ao VEGF e PlGF e bloquear sua atividade biológica (CHAIWORAPONGSA *et al.*, 2003).

Estudos mostram que a adição de sFlt-1 exógeno inibiu a invasão trofoblástica induzida pela ação do VEGF-A *in vitro* (ZHOU *et al.*, 2002). A concentração sérica do sFlt-1 encontra-se relativamente baixa no início da gravidez, aumentando na segunda metade, com pico de liberação máximo no terceiro trimestre. Esse comportamento parece ser fisiológico no controle da angiogênese placentária (KARUMANCHI; EPSTEIN, 2007; SMITH *et al.*, 2007a).

Outra forma de receptor solúvel é o sEndoglin (sEng), também antagonista da angiogênese. Age inibindo a diferenciação e migração das células endoteliais e regulação do tônus vascular mediada pelo óxido nítrico (LEVINE *et al.*, 2006b). O sEng é altamente expresso na superfície das células endoteliais e no sinciciotrofoblasto (SAVVIDOU *et al.*, 2008; VENKATESHA *et al.*, 2006). Assim, esse dois receptores solúveis e sobrenadantes, sFlt-1e o sEng, controlam a angiogênese placentária e encontram-se aumentados no plasma nos dois últimos meses da gravidez (LEVINE *et al.*, 2006b; RANA *et al.*, 2007).

2.2 Fatores de angiogênese na fisiopatologia da pré-eclâmpsia

A fisiopatologia da PE é multifatorial e algumas linhas de pesquisa têm sido investigadas, principalmente aquelas envolvidas nas etapas fundamentais da formação placentária (SILASI *et al.*, 2010). O balanço alterado entre fatores de angiogênese, a produção de autoanticorpos dos receptores de angiotensina 1 (AA-AT-1), o estresse oxidativo e os fatores genéticos são alguns exemplos que norteiam estudos recentes (WANG; RANA; KARUMANCHI, 2008; WIDMER *et al.*, 2007).

A placenta endócrina produz muitas citocinas angiogênicas que têm a peculiaridade de induzir e controlar a angiogênese placentária e, uma vez presentes na circulação sistêmica materna, em concentração não fisiológicas, interagem com as células endoteliais desencadeando lesão de forma gradativa antes do surgimento clínico da pré-eclâmpsia (FIG 2).

Em resposta a perda de líquido do vaso sanguíneo para o intertício, há reatividade vascular, liberação de agentes vasopressores e ativação da cascata

de coagulação. Postula-se que o excesso isolado de sFlt-1 no plasma materno lese diretamente as células endoteliais no organismo materno e além disso, o sFlt-1 impede a ação protetora e vasodilatadora do VEGF e PlGF ao formar com essas proteínas angiogênicas complexos inativos. Experimento anterior e de grande relevância mostrou que adenovírus contendo sFlt-1 ao serem injetados em ratas prenhas e não prenhas resultou no surgimento de hipertensão, proteinúria e endoteliose glomerular, achados clássicos e semelhantes aos encontrados na pré-eclâmpsia (MAYNARD *et al.*, 2003).

Outra proteína antiangiogênica apontada na gênese da lesão das células endoteliais, com ação semelhante e potenciadora do sFlt-1, é o endoglim solúvel (sEng), que da mesma forma também aumenta no plasma antes da manifestação clínica da pré-eclâmpsia e tem sido estudado como potencial preditor. Quando sFlt-1 associados a sEng foram infundidos em ratas prenhas, houve piora da lesão endotelial nos rins, nos vasos sanguíneos e na placenta. Nos sinusóides hepáticos, os achados patológicos ao da síndrome hemolysis, elevated enzymes liver, low platelets count (HELLP) (VENKATESHA *et al.*, 2006). Outro estudo também encontrou uma relação entre o aumento do sEng associado ao sFlt-1 na forma grave da pré-eclâmpsia, a HELLP síndrome (DAVISON *et al.*, 2004).

Um importante achado histológico da ação do sEng e do sFlt-1 é a perda das fenestrações vasculares das células endoteliais, e essa ocorrência no tecido renal leva a perda de podócitos no filtrado glomerular. A presença de podócitos na urina também tem sido investigada como preditor específico de lesão renal e de sua gravidade clínica (KARUMANCHI *et al.*, 2005; RANA *et al.*, 2007).

Camundongos *knockout* para VEGF-A apresentaram doença renal caracterizada por proteinúria e endoteliose glomerular (EREMINA *et al.*, 2003) mostrando que o VEGF parece ser necessário na reparação (saúde) dos capilares glomerulares e na manutenção das fenestrações fisiológicas no endotélio vascular (MASUDA *et al.*, 2001). Endotélio fenestrado, além de encontrado no glomérulo renal, pode ser visto no plexo coroide e nos sinusóides hepáticos. Esses órgãos são desproporcionalmente afetados na pré-eclâmpsia. Assim, deficiência de VEGF, se

induzida por anticorpos, deleção genética ou excesso de sFlt1, provavelmente irá desencadear endoteliose glomerular, proteinúria e lesão endotelial hepática (KARUMANCHI *et al.*, 2005; WANG; RANA; KARUMANCHI, 2008).

Outros experimentos laboratoriais reforçam as evidências de que os fatores de angiogênese estão envolvidos na patogenia da pré-eclâmpsia. Modelos de PE foram desenvolvidos em laboratórios através da infusão de sFlt-1 em ratas prenhas, e o uso contínuo do VEGF-121 reduziu os achados característicos da hipóxia tecidual na placenta, fígado e rins. Houve também melhora da hipertensão arterial induzida e da perda de proteína na urina desses animais. Essa resposta foi dose-dependente e a infusão contínua de VEGF121 durante cinco dias regularizou os níveis séricos de sFlt-1 (LI *et al.*, 2007). Outros modelos experimentais de hipóxia placentária induzida mecanicamente em laboratório (ratos, babuínos) também mostraram elevação de sFlt-1 no sangue, associado ao aumento da pressão arterial, alteração renal e disfunção endotelial (GILBERT; BABCOCK; GRANGER, 2007; MAKRIS *et al.*, 2007).

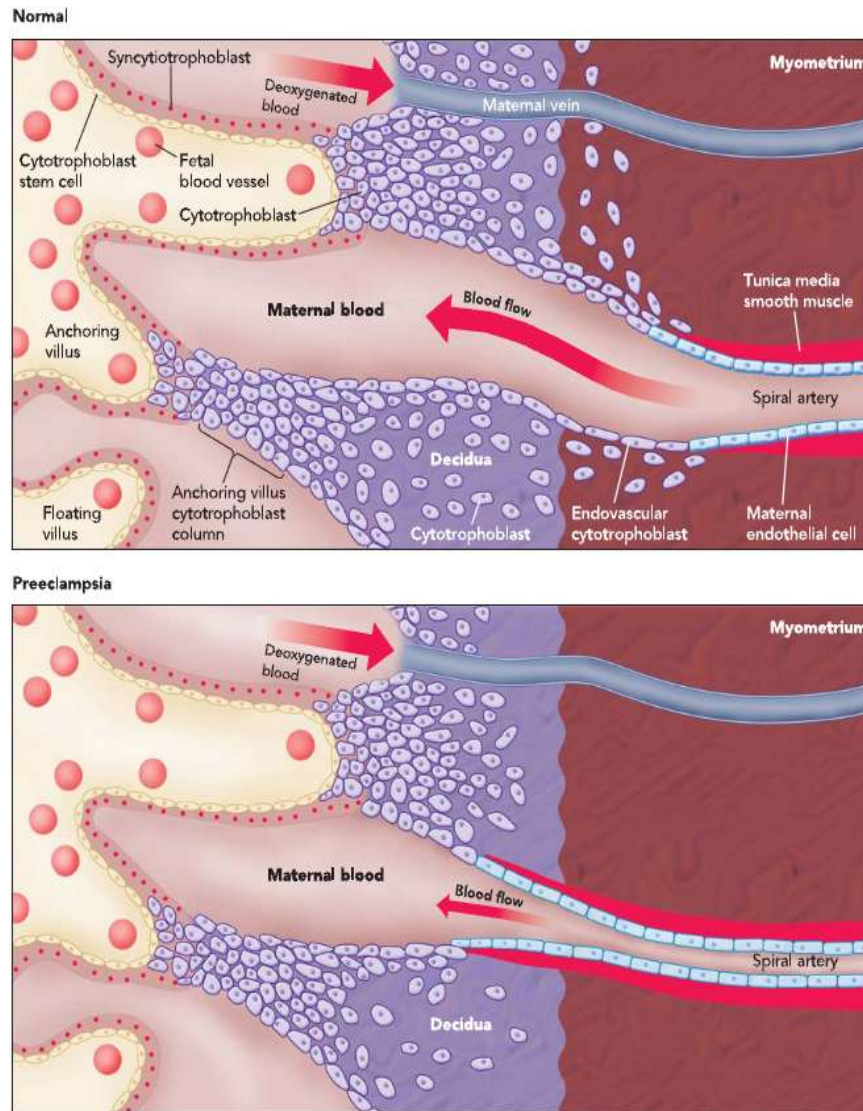


FIGURA 1 - Placentação anormal na pré-eclâmpsia.

No desenvolvimento normal da placenta, o citotrofoblastos de origem fetal invade as artérias espiraladas maternas, transformando vasos de alta resistência e pequeno calibre, em vasos de alta capacitância, capazes de fornecer perfusão placentária adequada para sustentar o crescimento fetal. Durante o processo de invasão vascular, o citotrofoblastos diferencia seu fenótipo de células epiteliais para endoteliais, processo conhecido como pseudovasculogênese ou "mimetismo vascular". Na pré-eclâmpsia, o citotrofoblastos deixa de adotar um fenótipo endotelial e a invasão das artériolas espiraladas é incompleta. Os vasos continuam de pequeno calibre e alta resistência (parte inferior).

Fonte: adaptada de Lam, Lim e Karumanchi (2005).

A falha em estabelecer uma rede vascular de baixa resistência na gravidez se inicia muito cedo, levando ao estado de hipóxia placentária (DEKKER; SIBAI, 1998; DUCKITT; HARRINGTON, 2005). No entanto, se a falha de invasão leva à hipóxia, ou o contrário, é uma incógnita (KARUMANCHI; BDOLAH, 2004; KARUMACNHI; EPSTEIN, 2007). Como consequência à hipóxia, as células epiteliais do citotrofoblasto alteram a expressão gênica dos fatores angiogênicos e a sua capacidade de mudança fenotípica denominada mimetismo celular (ZHOUY; DAMSKY; FISHER, 1997). O *déficit* na expressão dessas moléculas de superfície interfere no movimento do trofoblasto intravascular nas arteríolas espiraladas miometriais e na angiogênese placentária (KAUFMANN; BLACK; HUPPERTZ, 2003; PIJNENBORG *et al.*, 1983). A atividade invasiva do trofoblasto *in vitro* diminui na presença de sFlt-1 (ZHOU *et al.*, 2002) e a queda na percentagem de oxigênio no citotrofoblasto causa aumento na concentração isolada de sFlt-1 (NAGAMATSU *et al.*, 2004). No tecido placentário da pré-eclâmpsia, a concentração de sFlt-1 está aumentada duas a cinco vezes em relação à placenta de gestantes normotensas (LI *et al.*, 2005; MAYNARD *et al.*, 2003).

Fatores angiogênicos circulantes secretados pela placenta e que causam disfunção endotelial têm sido mensurados no sangue periférico, líquido amniótico e tecido placentário, como marcadores e preditores de pré-eclâmpsia no primeiro, segundo e terceiro trimestres da gravidez (EVANS *et al.*, 1998; LEVINE *et al.*, 2004; NOORI *et al.*, 2010; TAYLOR *et al.*, 2003; TRANQUILLI *et al.*, 2004; VATTEN *et al.*, 2007; WELCH *et al.*, 2006; WOLF *et al.*, 2005).

Concentrações baixas de VEGF e PIGF livres e elevadas de sFlt-1 e/ou sEng no plasma materno são mais pronunciadas nas formas precoces e graves da pré-eclâmpsia (LEVINE *et al.*, 2004; 2006b; LIVINGSTON *et al.*, 2000; NOORI *et al.*, 2010; ROBINSON; JOHNSON, 2007; UNAL *et al.*, 2007). Baixas concentrações de PIGF foram encontradas no plasma das gestantes com PE em relação as gestantes normotensas e essa queda se correlacionada de forma direta com à elevação da pressão arterial média (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Revisão sistemática sobre alteração de fatores angiogênicos na gravidez realçou que gestações complicadas com crescimento intrauterino restrito (CIUR) apresentavam também elevação no sEng e sFlt-1 e que esses marcadores parecem não serem específicos de PE, e sim de disfunção placentária relacionada a hipóxia e suas conseqüências (EREZ *et al.*, 2008).

Em suma, fatores de angiogênese livres no plasma em concentrações diferentes da fisiológica, com aumento das formas livres dos receptores solúveis (sFlt-1 e sEng), concomitantes a queda das formas livres do PlGF e VEGF, durante ou antecedendo os sinais/sintomas clínicos, têm sido propostos como modelo do balanço angiogênico encontrado na pré-eclâmpsia (BAUMANN *et al.*, 2008; BDOLAH; SUKHATME; KARUMANCHI; BDOLAH, 2004; McKEEMAN *et al.*, 2004; RANA *et al.*, 2007).

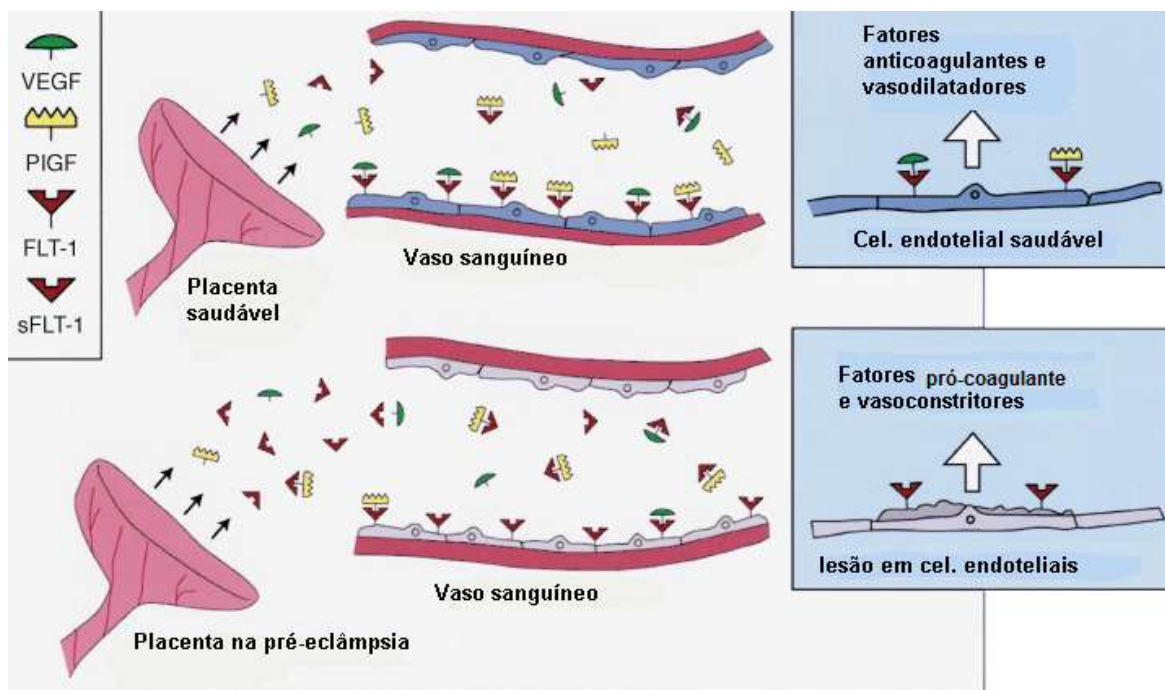


FIGURA 2 - Representação esquemática da liberação placentária quantitativa dos fatores de angiogênese na gestação normal e na gestação com pré-eclâmpsia, e sua interação com o endotélio vascular.

Na parte superior da gravura está representada uma placenta saudável em situações fisiológicas, liberando de forma equilibrada os fatores proangiogênicos (PlGF e VEGF) juntamente com o fator antiangiogênico (sFlt-1) dentro do vaso sanguíneo materno. O VEGF e PlGF se ligam aos receptores de membrana Flt-1 e ao sobrenadante sFlt-1. A interação receptor solúvel, receptor de membrana com o VEGF e PlGF mantém a saúde do endotélio vascular, o estado de anticoagulação e a vasodilatação capilar. Na PE, a liberação placentária excessiva de receptores livres (sFlt-1) faz com que haja formação de complexos livres e inativos de VEGF e PlGF e essas moléculas vasodilatadoras deixam de proteger o endotélio vascular das gestantes, desencadeando lesão endotelial, liberação de agentes vasoativos e pró-coagulantes, parte inferior da gravura.

Fonte: adaptado de Karumanchi *et al.* (2005).

2.2.1 Autoanticorpos antagonistas do receptor tipo I (AT1) da angiotensina II

Foi demonstrado que a Ang II pode estimular a produção do solúvel Fms-like receptor tirosina quinase (sFlt-1) nas células de linhagem trofoblástica (XIA *et al.*, 2003). Encontrou-se níveis plasmáticos e placentários elevados de sFlt-1 quando autoanticorpos dos receptores AT1 da angiotensina II (AT-1-AA) foram injetados em ratas prenhas ou colocados em cultura de vilos placentários (NOORI *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2007).

Os autoanticorpos antagonista do receptor 1 da angiotensina II e o sFlt-1 encontram-se elevados na pré-eclâmpsia (KARUMANCHI; LINDHEIMER, 2008; XIA; RAMIN, 2007; ZHOU *et al.*, 2008).

Modelos de PE induzidos pela infusão de AT1-AA foram utilizados para avaliar o potencial terapêutico do VEGF121. Imunoglobulina G (IgG) - (AT-1-AA) de gestantes com pré-eclâmpsia e com comprovada elevação do sFlt-1 foi usada para induzir PE em ratas prenhas. Os animais que recebiam continuamente VEGF121 tiveram pouca elevação da PA, da proteinúria, dos níveis séricos de creatinina, ácido úrico e de dano renal à histologia. A angiogênese placentária também se diferenciou nesses dois grupos, sendo deficiente no grupo que não recebia VEGF121. Esse estudo salienta que há provável bloqueio da ação do sFlt-1 pelo VEGF121 (GILBERT *et al.*, 2010).

2.2.2 As células natural killer

Células natural *killer* (NK) acumulam-se num denso infiltrado em torno do trofoblasto e vasos maternos na gravidez precoce (MOFFET-KING, 2002). Essa distribuição perivascular sugere papel na remodelação das arteríolas espiraladas (KOPCOW; KARUMANCHI, 2007; MATSUBARA *et al.*, 2005).

Na metade da gestação, essas células desaparecem, coincidentemente quando se finaliza a invasão trofoblástica (LI *et al.*, 2000). Estudos em ratas transgênicas

prenhas, deficientes em células NK, encontraram artérias espiraladas com diâmetro vascular estreito e sem vasodilatação (CROY *et al.*, 2003).

As células NK produzem VEGF, PlGF, Ang-1 e Ang-2, principais citocinas implicadas na angiogênese e estabilidade vascular. Na presença de células NK as células endoteliais tendem a formar tubulos, *in vitro*, e esse movimento celular parece ser devido a produção de fatores indutores da angiogênese (HANNA *et al.*, 2006).

2.2.3 O estresse oxidativo placentário

O desenvolvimento do tecido placentário é regulado pela tensão de oxigênio tecidual, que sofre profundas mudanças, com aumento progressivo na pressão de oxigênio (PO₂), de <20 mmHg na oitava semana para >50 mmHg até final do primeiro trimestre. Até que se estabeleça o espaço interviloso, o trofoblasto invade as arteríolas espiraladas endometriais e certo grau de oclusão vascular pode gerar mudanças no metabolismo celular aeróbio/anaeróbio (JAUNIAUX; WATSON; BURTON, 2001). Com o espaço interviloso formado, rápido aumento na concentração de oxigênio pode sobrecarregar a defesa antioxidante do tecido trofoblástico e resultar no estresse oxidativo, com conseqüente dano à síntese de proteína, lipídios e expressão de ácido desoxirribonucleico (DNA), prejudicando a função celular (WANG; WALSH, 2001). A mitocôndria, principal organela geradora de radicais livres, é extremamente suscetível à tensão de oxigênio e muda sua estrutura morfológica de maneira reversível, conforme altas e baixas taxas de respiração celular. A má-adaptação mitocondrial e a dificuldade em induzir enzimas antioxidantes podem gerar estresse oxidativo crônico e ativar a cascata de apoptose, resultando em baixa perfusão placentária (WANG; WALSH, 1998). Essa falha na defesa antioxidante do trofoblasto pode estar envolvida na patogenia da pré-eclâmpsia (HUBEL, 1999).

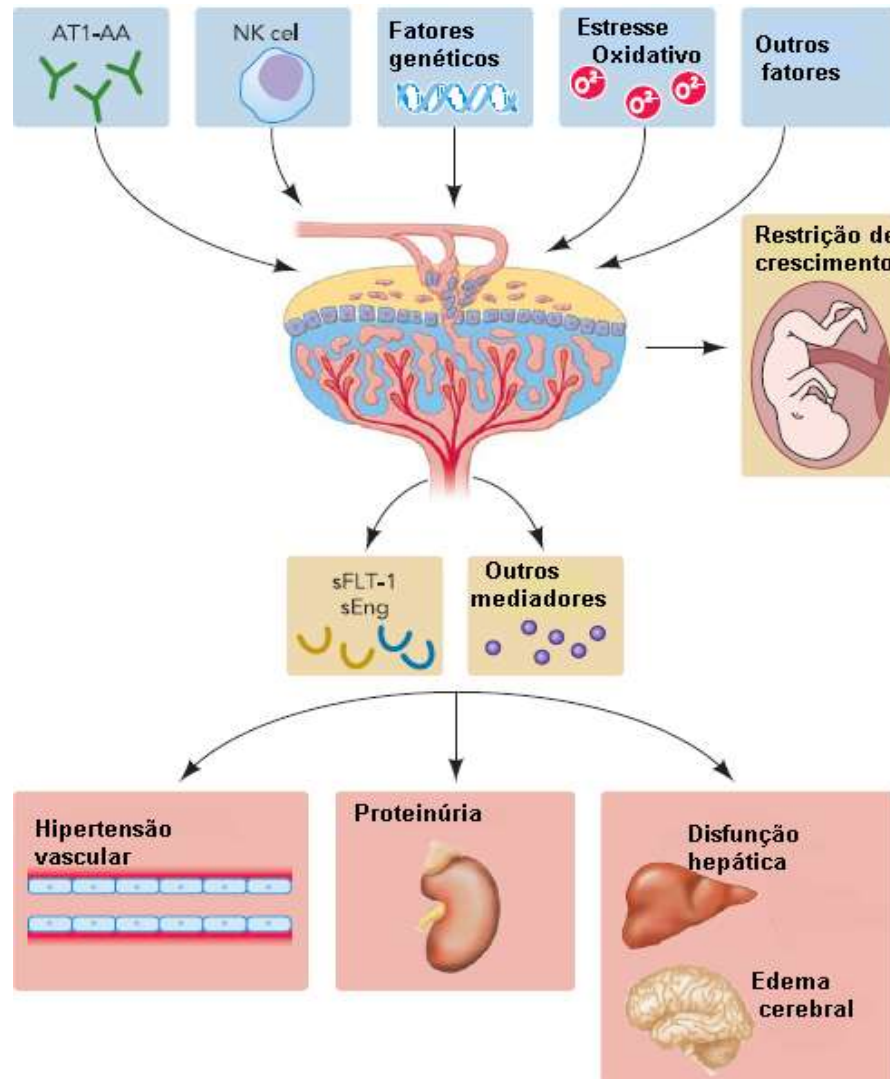


FIGURA 4 – Fisiologia da pré-eclâmpsia.

A FIG. 4 mostra os principais fatores envolvidos na etiologia multifatorial da pré-eclâmpsia. A placenta é o ponto central desse distúrbio, por produzir fatores angiogênicos e outras proteínas que, ao interagirem com os sistemas endoteliais dos vasos periféricos, dos glomérulos renais, dos hepáticos e do cérebro, reproduzem os achados histopatológicos, os sinais e sintomas característicos da pré-eclâmpsia.

Fonte: adaptado de Wang, Rana e Karumanchi (2008).

A pré-eclâmpsia é conhecida como doença das teorias, mas pontos obscuros da sua gênese vem sendo intensamente investigados e esclarecidos. A multifatorialidade dessa síndrome converge para um ponto central que é a formação placentária e sua função endócrina. Os fatores de angiogênese presentes no plasma e urina parecem retratar as alterações no balanço angiogênico encontrado nas gestantes que desenvolvem pré-eclâmpsia. Além disso tornou-se possível a quantificação do sFlt-1 e do PIGF através de técnicas mais rápidas e precisas abrindo perspectiva quanto ao seu uso clínico como marcadores bioquímicos e de predição da preeclâmpsia.

2.3 Biomarcadores de pré-eclâmpsia

O mecanismo gênese da PE ocorre muito cedo na gravidez (DEKKER; SIBAI, 1998) e por essa razão muito se investe em testes de predição fundamentados na disfunção placentária, nos marcadores de resposta inflamatória e ativação do sistema de coagulação e da lesão endotelial (CONDE-AGUDELO; ROMERO; LINDHERIMER, 2009; SIBAI, 2007; WANG; RANA; KARUMANCHI, 2008). Muitos marcadores biofísicos e bioquímicos têm sido propostos como preditores de pré-eclâmpsia (BAUMANN; BERSINGER; SURBEK, 2007). O mais antigo marcador biofísico estudado na predição de PE é o doppler de artérias uterinas, por refletir os eventos placentários, predizer pré-eclâmpsia com e sem restrição de crescimento fetal e resultado adverso perinatal (CAMPBELL; BEWLEY; COHEN-OVERBROOK, 1987; KHONG *et al.*, 1986). E relação aos marcadores bioquímicos, há uma gama de proteínas que refletem a lesão endotelial encontrada na pré-eclâmpsia, mas nas últimas décadas, atenção especial tem sido dada aos fatores de angiogênese, pela sua capacidade de interagir diretamente sob as células endoteliais e desendear danos reversíveis (MAYNARD *et al.*, 2003; POWERS *et al.*, 2004).

A grande variação no valor preditivo desses biomarcadores, de forma geral, ainda limita o seu uso rotineiro na prática da obstetrícia e instiga pesquisadores a rever

dados da literatura e prosseguir com mais estudos com o intuito de aumentar a acuidade preditiva positiva dessa doença potencialmente grave (CONDE-AGUDELO; ROMERO; LINDHEIMER, 2009; WIDMER *et al.*, 2007).

2.3.1 Marcador biofísico

2.3.1.1 Doppler de artérias uterinas

O estudo doppler iniciou-se há séculos (1803-1853), quando Johann Christian Doppler publicou as bases teóricas sobre a diferença da aproximação e afastamento de moléculas em relação a um ponto fixo. Após ter sido utilizado em várias áreas da ciência, alcançou a área médica a partir dos estudos de Satomura, em 1957, ao acessar a velocidade e direção do fluxo sanguíneo cardíaco (GUZMANN; KONTOPOULOS; ZALUD, 2005). Em especial na obstetrícia, seu uso tem a finalidade de investigar a hemodinâmica dos vasos maternos e fetais e esclarecer processos patogênicos (SCHULMAN *et al.*, 1986; THALER *et al.*, 1992). O doppler das artérias uterinas pode ser obtido em mais de 95% das gestantes e sua característica bifásica, com pico sistólico e diastólico, S/D ou A/B, sofre influência do ciclo cardíaco e do ângulo de insonação do vaso (PAPAGEORGHIU *et al.*, 2001). Anormalidade no doppler das artérias uterinas foi associada à hipertensão com proteinúria, aumento da necessidade de anti-hipertensivo, prematuridade e baixo peso ao nascer (CAMPBELL *et al.*, 1986, 2000).

Alterações histológicas no miométrio relativas à migração trofoblástica incompleta foram encontradas em 95% das gestantes com anormalidade nas artérias uterinas (LIN *et al.*, 1995). Outros estudos de biópsias de leito placentário nas gestantes com PE e/ou restrição de crescimento fetal reforçam a teoria placentária na origem de complicações obstétricas no período gravídico-puerperal (GUZIN *et al.*, 2005; KHONG *et al.*, 1986).

Fisiologicamente, o fluxo sanguíneo uterino aumenta na gravidez em decorrência da queda na complacência vascular e, como consequência, há queda na relação

sístole/diatole na onda das artérias uterinas (FIG. 5). A incisura protodiastólica, definida como queda na velocidade no final da sístole abaixo da velocidade diastólica máxima, desaparece entre 20 e 26 semanas. A técnica do doppler, se contínuo ou pulsado, e o tipo de sonda usada, vaginal ou transabdominal, não influenciam nos resultados do estudo doppler das artérias uterinas (SCHULMAN *et al.*, 1986; THALER *et al.*, 1992).

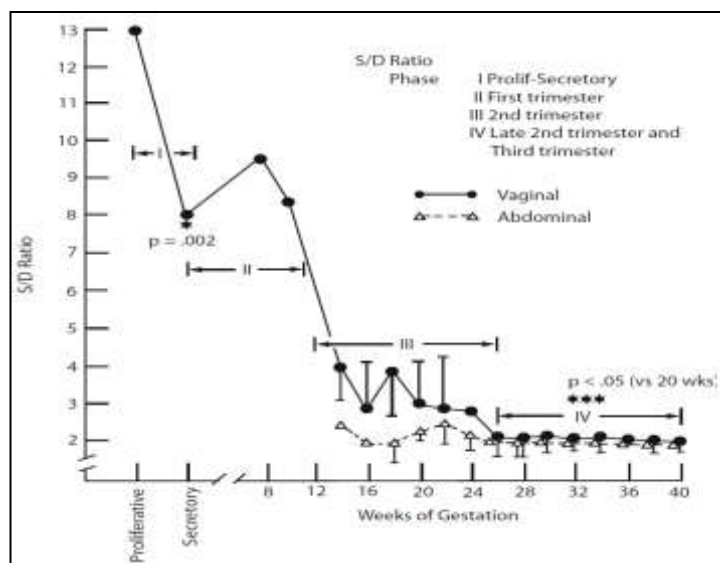


FIGURA 5 - Representação da variação média entre sístole e diástole das artérias uterinas durante o ciclo menstrual, no primeiro, segundo e terceiro trimestres da gravidez.

A linha superior com pontos cheios representa exame realizado com transdutor endovaginal e a inferior transabdominal (SCHULMAN *et al.*, 1986).

O doppler da artéria uterina tem sido avaliado em vários momentos da gravidez, no primeiro, segundo e terceiro trimestres como marcador preditivo e de gravidade de PE, CIUR e resultado perinatal adverso (ALBAIGES *et al.*, 2000; GHI *et al.*, 2009; PAPAGEORGHIOU *et al.*, 2001; PILALIS *et al.*, 2007,

PLASENCIA *et al.*, 2007) em gestantes de baixo e alto risco (CHIEN *et al.*, 2000; COLEMAN; McCOWAN; NORTH, 2000; SCHWARZE *et al.*, 2005).

2.3.1.2 Índices do doppler das artérias uterinas

A) Incisura bilateral diastólica

Fleisher foi o primeiro a descrever a importância da incisura nas artérias uterinas nas desordens hipertensivas e sua sobreposição em gestantes com hipertensão arterial crônica (FLEISHER *et al.*, 1996). A incisura diastólica e sistólica após 26 semanas também se correlacionou a resultado perinatal adverso, sendo essa relação mais pronunciada na incisura diastólica isolada. Seu achado numa fase precoce da gravidez, entre 17 e 25 semanas, poderia ser indício de anormalidade e prever pré-eclâmpsia (THALER *et al.*, 1992). Recente revisão sistemática considerou como critério de seleção o limite de idade gestacional menor ou de até 25 semanas de gravidez para estudos de predição de PE, afastando assim a possibilidade de rastrear doença que na verdade se encontra em uma fase subclínica (CNOSSEN *et al.*, 2008).

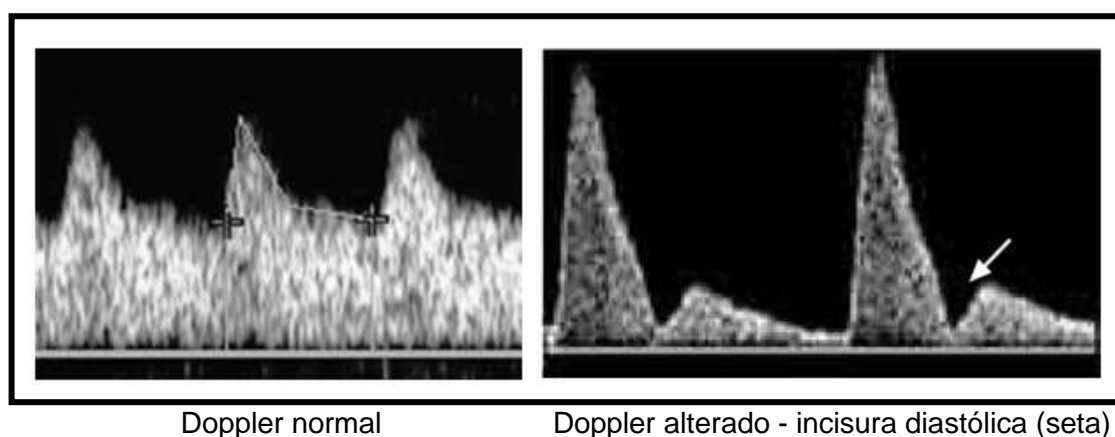


FIGURA 6 - Doppler de artéria uterina mostrando baixa resistência no fluxo diastólico e ausência de incisura, características de condições fisiológicas.

Ao lado, uma artéria uterina alterada com alta resistência e complacência vascular (relação S/D) e incisura protodiastólica (seta)

No primeiro trimestre da gravidez, a incisura protodiastólica nas artérias uterinas tem baixo poder de predição de PE e CIUR em decorrência da alta prevalência deste achado em gestantes saudáveis, que é de aproximadamente 45% (GOMEZ, 2006; MELCHIORRE *et al.*, 2008). No entanto sua presença foi o segundo índice mais estudado nas pacientes de alto risco e apresentou especificidade elevada (89%) principalmente quando a bilateralidade era o critério exigido (CNOSSEN *et al.*, 2008).

B) Outros índices do doppler

O espectro de onda da artéria uterina pode ser analisado de forma semiquantitativa e a maioria das pesquisas tem se centrado na elevação do índice de resistência (IR) ou de pulsatilidade (IP) ou índice de Stuart-Drumm: sístole/diástole (A/B) associado ou não à persistência de incisura diastólica como reflexo de onda de alta resistência vascular útero-placentária (CNOSSEN *et al.*, 2008; CONDE-AGUDELO; ROMERO; LINDHEIMER, 2009; PAPAGEORGHIU *et al.*, 2001). Juaniaux enfatizou queda fisiológica no IR e na IP da artéria uterina ao longo da gravidez (JUANIAUX *et al.*, 1992).

Na pré-eclâmpsia, um desvio-padrão maior que dois na média do IP ou *cutoff* \geq 95% por idade gestacional foi considerado anormal; e no primeiro trimestre identifica 30,8% das gestantes que posteriormente desenvolverão complicações precoces e graves (GOMEZ *et al.*, 2006; MELER *et al.*, 2010). O aumento da resistência das artérias uterinas no segundo trimestre tem sido consistente em prever casos de PE precoce, com baixa sensibilidade para casos que ocorreram acima de 34 semanas (YU *et al.*, 2005). O IP apresentou baixa sensibilidade (42%) e boa especificidade (91%) na predição de qualquer forma de PE. Para o mesmo objetivo, o IR apresentou mais sensibilidade (74%), porém sua especificidade (79%) foi mais baixa quando comparada com outros índices do doppler das artérias uterinas (CNOSSEN *et al.*, 2008).

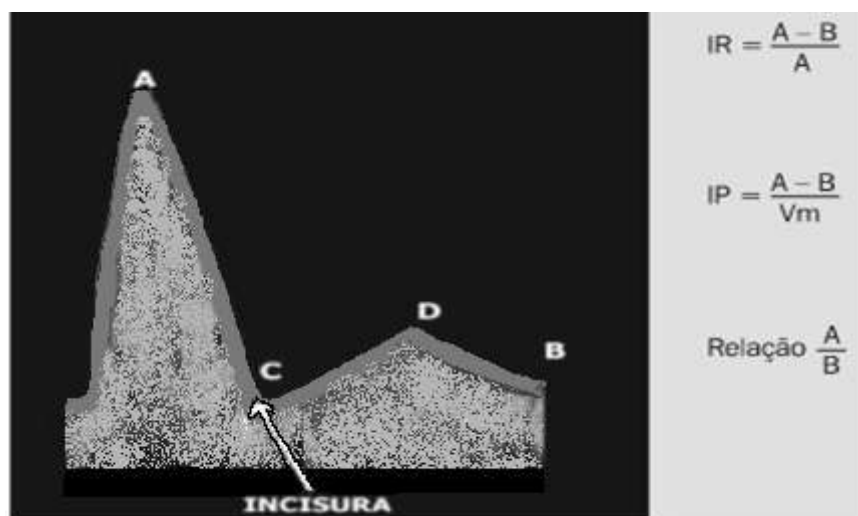


FIGURA 7 - Parâmetros do espectro da onda uterina e índices doppler.

A: pico sistólico, B: final da diástole, C: início da diástole, D: pico diastólico, V_m : velocidade média, IR: índice de resistência e IP: índice de pulsatilidade.

A associação de índices espectral das artérias uterinas tem sido utilizada com objetivo de aumentar a sensibilidade de predição de PE, e a maioria dos estudos inclui nessa associação metodológica a incisura bilateral como critério de anormalidade avaliando populações não selecionadas ou de alto risco (CHAN *et al.*, 1995, CHIEN *et al.*, 2000; LEES, 2000; PAPAGEORGHIU *et al.*, 2001; 2007; PILALIS *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2005).

Chan *et al.* (1995) investigaram o doppler das artérias uterinas em gestantes de alto risco nas 20^a, 28^a, 36^a semanas de gestação e mostraram que a melhor predição da pré-eclâmpsia ocorreu na 20^a semana da gestação, considerando como alteração da artéria uterina a combinação de $IR > p90$ e/ou existência de incisura bilateral. No entanto, a repetição do exame na 28^a semana aumentou, embora discretamente, o valor preditivo positivo para PE. Outros estudos com elevado número de gestantes também realçaram benefícios na combinação do IR com incisura bilateral no segundo trimestre em predizer PE (CAMPBELL *et al.*, 2000). Por outro lado, a normalização dos parâmetros do doppler, mesmo que

tardamente, na gravidez diminui o risco de complicações em gestantes de alto risco (SOREGAROLI *et al.*, 2001).

Na pré-eclâmpsia de aparecimento tardio (≥ 34 semanas) notou-se mais alta incidência de complicações maternas (HELLP síndrome), taxas elevadas de cesariana, baixo peso fetal, admissão de recém-nascidos (RN) em unidade de terapia intensiva neonatal, quando o doppler de artérias uterinas estava alterado (incisura bilateral, IP ou IR elevados). Doppler alterado em gestantes com pré-eclâmpsia, mesmo tardia, foi marcador de piores prognósticos maternos e fetais (GHI *et al.*, 2009). Raramente ausência de fluxo no início da diástole ou diástole reversa é vista no terceiro trimestre da gravidez. No entanto, sua presença também tem sido associada a resultado perinatal adverso (GOMEZ *et al.*, 2006).

Boller e Cabral (1995) mostraram que o prognóstico materno de 108 pacientes portadoras de gravidez de alto risco poderia ser avaliado de maneira significativa utilizando como parâmetros a relação A/B e a incisura protodiatólica nas artérias uterinas. A incisura na artéria homolateral à placenta foi o achado isolado que melhor se associou a mau prognóstico gestacional (BOLLER; CABRAL, 1995) .

Doppler realizado entre 18 e 20 semanas destacou incisura bilateral em 27,7% dos casos. A sensibilidade da incisura bilateral para a pré-eclâmpsia foi de 100%, mas o valor preditivo positivo (VPP) foi de apenas 19,0%. Combinando a incisura bilateral com a relação $A/B > 2,6$, verificou-se reduzida diminuição da sensibilidade (87,5%), mas aumento expressivo no VPP (67,7%) para pré-eclâmpsia (MONTENEGRO *et al.*, 1998).

Recente metanálise concluiu que o IP, isolado ou associado à persistência de incisura bilateral após 24 semanas, foi o melhor parâmetro preditor de PE, principalmente na forma grave e precoce. A acurácia do doppler em predizer pré-eclâmpsia foi melhor em relação ao rastreamento de fetos com CIUR isolado (CNOSSEN *et al.*, 2008).

Estudo anterior envolvendo 2.361 gestantes com e sem incisura bilateral após 28 semanas evidenciou diferença estatisticamente significativa na incidência de CIUR (44,7 vs 8,9%), sofrimento fetal (34,2 vs 3,0%) e hipertensão induzida na gravidez (73,7 vs 7,6%). De acordo com esse estudo, o VPP de alterações na artérias uterinas, para resultado perinatal adverso, foi de 47,5%, ao passo que na incisura bilateral o valor preditivo positivo foi de 82,9% (PARK *et al.*, 1996). Outro trabalho nessa mesma idade gestacional, 28 semanas, comparando doppler normal com alterado, apresentou alto risco de pré-eclâmpsia quando o doppler se encontrava alterado (*likelihood ratio* - LR 7,6) (SOREGAROLI *et al.*, 2001).

Gestantes com PE precoce foram selecionadas e o doppler de artérias uterinas foi obtido em 120 gestantes. Como parâmetro de anormalidade utilizou-se o escore Z para avaliar os desvios da normalidade. Ao todo, 53% das gestantes tinham doppler alterado (IP \geq 2 desvios-padrão e incisura bilateral), que se associou a quadros de evolução mais graves para as gestantes e os fetos. Quanto ao prognóstico evolutivo da gravidez, parece que o doppler das artérias uterinas é melhor marcador de PE precoce (MELER *et al.*, 2010).

Além da análise dos vários índices da onda das artérias uterinas, fatores de epidemiológicos de risco materno e marcadores bioquímicos também tem sido propostos em associações com o doppler como teste de *screening* na predição de pré-eclâmpsia (CHIEN *et al.*, 2000; LEES, 2000, PAPAGEORGHIU *et al.*, 2005; PILALIS *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2005).

2.3.1.3 Doppler das artérias uterinas nas gestantes hipertensas crônicas

Doppler de artérias uterinas alterado na 20ª semana em gestantes hipertensas crônicas identifica mais de 80% de complicações associadas à insuficiência placentária, como pré-eclâmpsia, baixo peso fetal, descolamento placentário, óbito fetal ou morte neonatal precoce. Mulheres com doppler normal apresentaram comportamento semelhante ao da população de gestantes de baixo risco (HARRINGTON *et al.*, 2004). Doppler alterado entre 19 e 26 semanas

detecta 50% dos casos destinados a desenvolver pré-clâmpsia, com risco relativo de 2,7 (AXT-FLIEDNER *et al.*, 2005). Em hipertensas crônicas em uso de medicação, doppler de artérias uterinas realizado entre 16 e 20 semanas foi capaz de prever sobreposição de PE em 21,2% delas (ZEEMAN *et al.*, 2003).

Frusca *et al.* (1998) encontraram pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão arterial sistêmica em 12% das gestantes com doppler de artérias uterinas alterado e em nenhuma com doppler normal. Seu estudo foi realizado em 78 gestantes com hipertensão arterial crônica entre 24 e 25 semanas de gravidez e nesse grupo a incidência de PE sobreposta foi de 3,9%. Doppler alterado (IR>0,58 e/ou incisura bilateral) abaixo de 24 semanas significa que a evolução para PE ocorre em 12% dos casos. E se a alteração persiste na 34^a semana de gestação, 36% evoluem com PE sobreposta. Portanto, a hipertensão crônica e o risco de desenvolvimento de PE sofrem influência da presença ou ausência de alteração no doppler das artérias uterinas (FRUSCA *et al.*, 1998, HARRINGTON *et al.*, 2004; POON *et al.*, 2009).

2.3.2 Marcador bioquímico

A hipótese de que a placenta elabora fatores de angiogênese solúveis que induzem disfunção das células endoteliais maternas na PE foi sugerida pela primeira vez por Roberts *et al.* (1989). Sua presença no plasma materno antes da manifestação clínica da PE faz delas promissoras moléculas preditivas de pré-eclâmpsia. Numerosos biomarcadores foram avaliados como preditivos de PE, mas nenhum deles consolidou seu valor clínico. Os mais promissores marcadores séricos de screening de PE numa fase relativamente precoce na gravidez são o PIGF e sFlt-1 livres (BAUMANN *et al.*, 2008).

2.3.2.1 VEGF, PIGF e sFlt-1 na predição de pré-eclâmpsia

Importantes estudos longitudinais retrospectivos caracterizaram o perfil da concentração sérica dos fatores de angiogênese em vários intervalos durante a

gravidez normal e nas gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia. No estudo caso-controle do uso do cálcio para prevenção de PE, amostras de plasma foram armazenadas mensalmente e a curva do PIGF, VEGF e sFlt-1 livres foram desenhadas para gestantes normais e nas que tiveram pré-eclâmpsia. Outros autores também reportaram que essas mudanças na concentração das formas livres dos fatores de angiogênese são mais pronunciadas e precoces e podem anteceder cinco a 11 semanas a manifestação clínica dessa síndrome (LEVINE *et al.*, 2004; CHAIWORAPONGSA *et al.*, 2005; NOORI *et al.*, 2010; WIDMER *et al.*, 2007). Além disso, a queda do sFlt-1 diminui lentamente no pós-parto (POWERS *et al.*, 2004).

Quantitativamente, os níveis séricos do sFlt-1 e PIGF na fase pré-sintomática da PE correlacionam-se com as formas graves e precoces. No segundo trimestre da gravidez foram encontrados níveis séricos baixos de PIGF e altos de sFlt-1 entre a 22^a e a 36^a semanas de gestação em gestantes de alto risco de pré-eclâmpsia. A relação sFlt-1/PIGF entre 22 e 26 semanas foi altamente eficaz na predição de pré-eclâmpsia precoce (MOORE SIMAS *et al.*, 2007).

De acordo com alguns estudos, a alteração do sFlt-1 ao longo da gravidez parece ser o melhor marcador isolado de PE, entre outros marcadores de angiogênese (ROMERO *et al.*, 2008 ; WATHEN *et al.*, 2006).

Os fatores de angiogênese foram analisados em relação aos semestres da gravidez como preditores de PE. No primeiro trimestre, os resultados indicavam comportamento diferente do PIGF em relação ao sFlt-1 (ROMERO *et al.*, 2008). Parece consenso entre os autores de que apenas os níveis de PIGF mostram-se reduzidos antes da pré-eclâmpsia (VATTEN *et al.*, 2007), enquanto outros marcadores, sFlt-1 e VEGF apresentam níveis séricos conflitantes ou ausência de correlação (RANA *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2007a).

Muitos estudos de predição dos fatores angiogênicos no início e final do segundo trimestre da gravidez foram analisados (TAB. 1). De modo geral, a sensibilidade variou de 59 a 100%, a especificidade de 51 a 100%, as razões de

verossimilhança positiva e negativa para o PIGF, sFlt-1, para todos os casos de pré-eclâmpsia, variou de 1,3 ao infinito e de 0,0 a 0,8, respectivamente. Para a pré-eclâmpsia de início precoce, a sensibilidade e especificidade variaram de 77 a 100% e 51 a 87%, respectivamente. Esse dados reforçam que a predição positiva dos fatores angiogênicos é melhor para PE de início precoce. A relação sFlt-1/PIGF reflete as mudanças no equilíbrio entre sFlt-1 e PIGF e tem se mostrado mais eficaz na predição de pré-eclâmpsia do que qualquer medida isolada dos fatores de angiogênese (RANA *et al.*, 2007). No entanto, outros estudos não confirmaram aumento da predição positiva de PE utilizando dessa relação ou de qualquer outra relação entre os fatores de angiogênese (DIAB *et al.*, 2008; LIM *et al.*, 2008).

O PIGF urinário também tem sido registrado em baixas concentrações durante a gravidez nas gestantes que mais tarde desenvolveram PE e usado com *screening* de PE durante a gravidez (LEVINE *et al.*, 2005).

Outro receptor solúvel encontrado no plasma antecedendo complicações na gravidez é o sVEGF-R2. Esse biomarcador não se mostram específicos de PE, uma vez que significativa queda nos seus níveis séricos foi observada nas gestantes com fetos com CIUR (CHAIWORAPONGSA *et al.*, 2008).

Em relação as desordens hipertensivas da gravidez realizou-se um estudo no primeiro trimestre da gravidez, em torno da 10^a semana, tipo caso-controle de predição de PE e hipertensão gestacional. Nesse estudo o PIGF e sFlt-1 foram dosados e como resultado, baixas concentrações de PIGF aumentou duas vezes o risco de PE. A associação do aumento sérico de sFlt-1 mais fatores de risco materno, aumentou mais que o triplo o risco de pré-eclâmpsia. A análise da associação do PIGF, sFlt-1 e fatores de risco maternos não foi significativamente diferentes nas gestantes que desenvolveram hipertensão gestacional (THADHANI *et al.*, 2004).

Estudo-piloto sugeriu que o sEng pode ser útil na diferenciação da PE de outras desordens hipertensivas da gravidez, como hipertensão gestacional e hipertensão

arterialcrônica. Parece que o sEng é inespecífico quanto à predição isolada de PE (SALAHUDDIN *et al.*, 2007).

Diversas pesquisas têm avaliado o sEng combinado ao sFlt-1, ao PIGF (LEVINE *et al.*, 2006b; RANA *et al.*, 2007) e à relação PIGF/sEng em vários momentos durante a gravidez, para esclarecimento sobre o uso desse biomarcador como *screening* de pré-eclâmpsia na gravidez (EREZ *et al.*, 2008). Dados de estudos retrospectivos e prospectivos têm descrito significativo aumento de ambos, sFlt1 e sEng, no plasma desde o início da gravidez (LEVINE *et al.*, 2006b; PARK *et al.*, 2005; WATHEN *et al.*, 2006). As elevações de sEng e da relação sFlt1/PIGF no final do segundo e início do terceiro trimestre estão associados a risco significativamente elevado de desenvolvimento de PE precoce. A relação sFlt1/PIGF tem se revelado índice mais significativo e melhor preditor de PE em comparação aos fatores angiogênicos isolados (LEVINE *et al.*, 2005).

Recente avaliação de coorte longitudinal prospectiva avaliou o risco de PE no primeiro trimestre da gravidez usando a relação PIGF/sEng vs sFlt1 e obteve sensibilidade de 100%, especificidade de 95,3%, valor preditivo negativo de 100% e verossimilhança positiva de 57,6 (KUSANOVIC *et al.*, 2009).

Tabela 1- Fatores de angiogênese na predição de pré-eclâmpsia

Autor, ano	n	IG	FA	Resultado	Cutoff	S (%)	E (%)	LR+	LR-
Hertz, 2004	23	25-28	sFit-1	PE	957ng/ml	88	100	*	0.1
Chaiworapongsa, 2005	44 casos 44 controle	24-28 28-32	PIGF	PE	90 pg/mL	93	94	16.6	0.1
Park, 2005	32 casos 128 controle	16-23	sFit-1	PE	500 pg/mL	59	62	1.6	0.7
Ye, 2006	172	26-28	sFit-1	PE	8.75 mg/L	88	97	33.7	0.1
Stepan, 2007	63	19-24	PIGF	PE	118 pg/mL	77	62	2.0	0.4
			sFit-1		500.5 pg/mL	62	70	2.1	0.5
			sFit-1/PIGF ratio		3.15	62	51	1.3	0.8
			sFit-1 + PIGF	PE e PE precoce	631.3/81.8 pg/mL	77	73	2.9	0.3
Espinoza, 2007	3296	22-26	PIGF	PE	280 pg/mL	69	51	1.4	0.6
				PE precoce		80	51	1.6	0.4
				PE grave		82	51	1.7	0.4
Chen, 2007	146	20-26	sFit-1	PE	3344 ng/mL	100	96	25.0	0.0
Diab, 2008	108	23	PIGF	PE	144 pg/mL	88	81	4.6	0.2
				PE precoce	134 pg/mL	100	76	4.2	0.0
				PE	614 pg/ml	96	87	7.4	0.1
				PE precoce	978 pg/ml	100	87	7.7	0.0
				PE	3.92	100	85	6.7	0.0
Lim, 2008	40 casos 100 controle	14-21	sFit-1	PE	2705.8 pg/mL	85	56	1.9	0.3
				sFit-1/PIGF ratio	20.5	85	67	2.6	0.3
De Vivo, 2008	52 casos 52 controle	24-28	PIGF	PE	382.5 pg/mL	92	81	4.8	0.1

IG: idade gestacional, FA: fatores de angiogênese, S: sensibilidade, E: especificidade, LR+: *likelihood* positivo, LR-: *likelihood* negativo, PE: pré-eclâmpsia,

Adaptado de LINDHEIMER, 2009

2.4 Aspectos atuais da predição da pré-eclâmpsia

A associação do doppler a várias proteínas e hormônios tem sido estudada como potencial marcador precoce de pré-eclâmpsia e suas formas clínicas. No primeiro e segundo trimestres da gravidez, concentrações elevadas de proteína 13 placentária (PP-13), gonadotrofina coriônica humana (hCG), alfa-fetoproteína, proteína A, leptina e fatores de crescimento insulina-like e inibina-A são preditoras de pré-eclâmpsia (AQUILINA *et al.*, 2001; NICOLAIDES *et al.*, 2006). Algumas dessas proteínas associadas ao doppler das artérias uterinas mostram benefícios na predição da pré-eclâmpsia (ESPINOZA *et al.*, 2007; SPENCER *et al.*, 2007; SIBAI *et al.*, 2008). O aumento quantitativo de células fetais livres no sangue materno e a alteração cromossômica também elevam a incidência de pré-eclâmpsia (BDOLAH *et al.*, 2006; COTTER *et al.*, 2004; SARGENT; GERMAIN; SACKS, 2003). No entanto, os fatores de angiogênese são específicos das células endoteliais e, assim como o doppler das artérias uterinas, têm similaridade no processo da formação placentária (LAM; LIM; KARUMANCHI, 2005).

2.5 Relação do doppler com os fatores de angiogênese na predição de pré-eclâmpsia

Para melhorar a capacidade preditiva dos testes individuais, alguns pesquisadores têm proposto combinações ou comparações de testes bioquímicos e biofísicos. Espinoza *et al.* (2007) realizaram estudo de coorte com 3.348 mulheres, avaliando a associação com o doppler das artérias uterinas alterado (incisura bilateral e/ou média do IP \geq p95%) e concentrações plasmáticas maternas do PIGF (*cutoff* <280 pg/mL) no segundo trimestre para predição de pré-eclâmpsia e suas formas grave e precoce. Em geral, a abordagem combinada melhorou a especificidade e os resultados positivos para a predição de todos os casos de pré-eclâmpsia e também das formas precoces, no entanto houve queda na sensibilidade preditiva na análise dos resultados (ESPINOZA *et al.*, 2007).

O melhor ponto de corte para o PIGF (*cutoff* de 144 pg/mL) e sFlt-1 (*cutoff* de 614 pg/mL) e da relação sFlt-1/PIGF (*cutoff* de 3,92) foi comparado ao doppler de artérias alterado (incisura bilateral e média de IP $\geq 1,45$), no segundo trimestre da gravidez (23 semanas) quanto à acuidade em predizer pré-eclâmpsia. A concentração plasmática de sFlt-1 estava aumentada e de PIGF diminuída nas gestantes que desenvolveram PE e/ou CIUR em relação ao controle e essa alteração foi mais pronunciada abaixo de 34 semanas de gestação. As respectivas sensibilidade e especificidade da relação sFlt-1/PIGF foram a maior (100 e 85%) entre os outros fatores de angiogênese: PIGF (88 e 81%) sFlt-1 (96 e 87%) e superior ao doppler (64 e 85%) na predição de todos os casos de pré-eclâmpsia (DIAB *et al.*, 2008).

Para investigar a precisão na predição de PE precoce/tardia e PE com CIUR no segundo trimestre da gravidez (24 semanas), utilizou-se o doppler das artérias uterinas (média do IP) e dos fatores angiogênicos (PIGF e sFlt-1). A combinação doppler alterado com o PIGF foi mais sensível em predizer PE precoce e/ou CIUR, mas para PE tardia a associação não trouxe benefício. Além disso, a sensibilidade do sFlt-1 foi menor (35%) que do doppler isolado (CRISPI *et al.*, 2008).

Não foi encontrada relação entre doppler alterado (34 gestantes) e fatores de angiogênese (PIGF e sFlt-1) numa coorte prospectiva composta de 222 gestantes analisadas entre 16 e 23 semanas. O resultado desse estudo sugere independência entre esse biomarcadores na predição de pré-eclâmpsia (MULLER *et al.*, 2006).

Os resultados da associação ou análise conjunta dos fatores de angiogênese com o doppler de artérias uterinas são conflitantes e, dessa forma, há necessidade de prosseguir com mais pesquisas em populações diversas, para universalizar pontos de corte e avaliar a aplicabilidade desses biomarcadores na predição da pré-eclâmpsia. O bloqueador de sFlt-1, o VEGF121, tem sido investigado e encontra-se em fase experimental, exibindo resultados animadores (GILBERT *et al.*, 2010). A possibilidade de controlar o balanço angiogênico no plasma abre

novas perspectivas terapêuticas e em breve espera-se beneficiar gestantes de risco de pré-eclâmpsia durante o pré-natal.

3 OBJETIVO

Verificar a capacidade dos fatores de angiogênese (PlGF e sFlt-1) e do doppler das artérias uterinas em prever pré-eclâmpsia nas gestantes normotensas em relação às gestantes com hipertensão arterial crônica, a partir do segundo trimestre da gravidez.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Pacientes

No período de dezembro de 2006 a janeiro de 2008, foram selecionadas 78 gestantes matriculadas no pré-natal do ambulatório do Hospital das Clínicas, para estudo transversal de predição de pré-eclâmpsia, a partir do segundo trimestre da gravidez, e que possuíam fatores de risco para essa condição. A análise dos resultados foi realizada em 71 gestantes que finalizaram o estudo.

O grupo acompanhado foi constituído por gestantes primigestas, hipertensas crônicas e gestantes com história anterior de pré-eclâmpsia. Elas foram agrupadas para a formação de dois grupos finais constituídos de gestantes normotensas (grupo A) e gestantes com hipertensão arterial sistêmica (grupo B). Pertenciam ao grupo B, cinco primigestas com hipertensão arterial sistêmica. Da mesma forma, oito (38%) com história prévia de pré-eclâmpsia e que continuaram hipertensas depois da gravidez foram distribuídas no grupo das hipertensas crônicas. O grupo A, no final, foi composto de 33 (71%) gestantes primigestas saudáveis e 13 (28%) com história de pré-eclâmpsia anterior sem sequelas de hipertensão arterial crônica. Todas apresentavam, no momento da inclusão, pressão arterial normal: pressão arterial sistólica (PAS) < 140 mmHg e pressão arterial diastólica (PAD) < 90 mmHg.

Assim, somavam-se, no final, 46 gestantes normotensas (grupo A) e 25 com história de HAS com controle clínico e/ou farmacológico adequado dos níveis pressóricos (grupo B).

Houve concordância das gestantes em participar deste estudo, na forma verbal e escrita no termo de consentimento pós-informado. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais, nº 078/05 (ANEXO A).

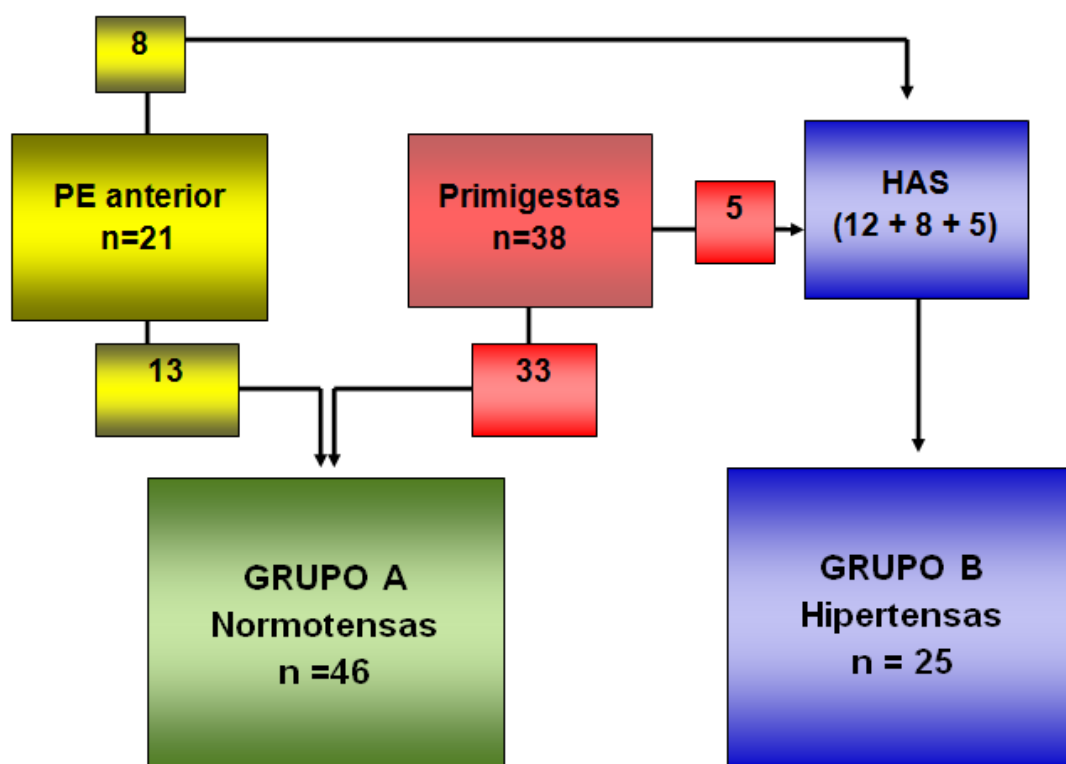


FIGURA 8 - Diagrama numérico das gestantes da coorte e subdivisão que formaram os grupos A e B.

4.1.1 Critério de exclusão

Foram excluídas gestantes tabagistas, diabéticas, com doenças autoimunes e aquelas com fetos múltiplos, portadores de anomalias estruturais ou de doenças que sabidamente alteram os fatores de angiogênese (CARMIELIET, 2003).

No final do estudo, 14 (19%) gestantes foram excluídas da análise estatística por não terem proteinúria caracterizada, embora tivessem elevação da pressão arterial no momento da internação para parto.

TABELA 2
Características comparativas entre as gestantes dos grupos A e B

Parâmetros	Grupo A n=46 (%) mediana	Grupo B n=25(%) mediana	p
Características gerais	-	-	-
Idade (anos)	18	32	<0,001
Paridade	1	3	<0,001
Raça n=70* (98%)	-	-	-
Branca	17(37%)	3 (12,5%)*	***
Não branca	29(63%)	21(87,5)*	***
IG coleta/doppler (semanas)	26,3	26,4	0,72
IG parto (semanas)	38,0	38,0	0,09
IG Doppler (semanas)	26,3	26,4	0,72
Pressão arterial (mmHg)	-	-	-
PAS	100	120	<0,001
PAD	60	80	<0,001
PAM	77	90	<0,001

IG: idade gestacional, PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica. PAM: pressão arterial média, RN: recém-nascido.

* uma gestante não foi classificada quanto a raça.
p, Kruskal-Wallis.

A TAB. 2 mostra que as gestantes do grupo A eram diferentes das gestantes do grupo B quanto a: idade, paridade e níveis da pressão arterial. A característica “ser da raça não branca” (87%) foi mais frequente nas hipertensas crônicas, assim como os níveis de pressão arterial. O doppler e a coleta de sangue foram realizados em idades gestacionais semelhantes ($p=0,72$).

4.1.2 Caracterização das gestantes do grupo A

Todas as gestantes do grupo A eram normotensas, independentemente da sua origem. Os dados clínicos gerais da idade, paridade, idade gestacional da coleta e pressão arterial estão descritos na TAB. 2.

4.1.3 Caracterização das gestantes do grupo B

Nas gestantes hipertensas crônicas foi averiguado o controle clínico com ou sem uso de anti-hipertensivo, em mono ou politerapia. O uso de α -metildopa foi o medicamento predominante no grupo e duas gestantes eram controladas com a associação de nifedipina e α -metildopa. Três não usavam anti-hipertensivo no início de pré-natal e permaneceram sem medicamento até o parto. Na TAB. 2 estão descritas as características dos dados das gestantes do grupo B.

Os dados laboratoriais das gestantes hipertensas crônicas foram colhidos no cartão de pré-natal e/ou prontuário uma única vez e na primeira consulta, como de rotina no pré-natal de risco. Mais dados laboratoriais de seguimento não foram colhidos. Uma gestante hipertensas crônica apresentou o mais alto nível de creatinina sérica do grupo (creatinina=1 mg/dL). Seus níveis de proteinúria de 24 horas eram de 250 mg/dL, ureia de 19 e clearance de creatinina de 82. Essa gestante tinha 39 anos, estava na sua quarta gestação e fazia uso de associação de anti-hipertensivo (nifedipina e α -metildopa) para controle da hipertensão arterial.

4.2 Métodos

4.2.1 Técnica do exame de dopplervelocimetria das artérias uterinas

Para realizar o exame de dopplervelocimetria das artérias uterinas, a posição de semi-fowler foi padrão para todas as gestantes. Utilizou-se o aparelho de ultrassom Medison – SonoAce e o transdutor convexo com 3,5 MHz de frequência e ângulo de insonação abaixo de 60 graus, com filtro de 100 Hz. O exame de ultrassonografia obstétrica foi realizado para avaliar a concordância cronológica e vitalidade fetal. Utilizou-se color-doppler no plano oblíquo da pelve para localizar a artéria uterina. O doppler pulsado mostrou o espectro de onda e após obterem-se pelo menos três ondas simétricas foi realizada a mensuração manual de uma delas.

A persistência de incisura, classificada de forma subjetiva pela queda na velocidade do fluxo sistólico e antes do fluxo máximo da diástole, foi considerada anormal após 26 semanas (FLEISHER *et al.*, 1996).

A maioria das ondas da artéria uterina foi copiada e anexada no livro de dados ao longo deste trabalho. A indicação do exame e o método aplicado para qualificar alteração no doppler seguiram protocolo da Maternidade do Hospital das Clínicas. O exame foi feito por examinador único com qualificação para realização de ultrassom e doppler em obstetrícia.

A persistência da incisura bilateral foi analisada no grupo A e B quanto a frequência e percentagem de distribuição no momento da inclusão das gestantes na coorte. A diferença da persistência da incisura bilateral no segundo trimestre da gravidez nas gestantes que compuseram o grupo das normotensas em relação ao grupo das hipertensas crônicas foi analisada através de testes estatísticos.

4.2.2 Coleta de sangue

Amostra de 10 mL de sangue periférico foi obtida por punção da veia anticubital, com a paciente na posição sentada, utilizando-se álcool 70% para antissepsia prévia. Empregou-se o sistema de Vacutainer estéril contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Num período inferior a 30 minutos da coleta, o plasma foi centrifugado a 4.000 rotações por minutos, durante 10 minutos a -4°C .

O sobrenadante foi congelado em *ependorf* com capacidade para 3 mL devidamente marcados e armazenados em contêiner de nitrogênio líquido, a -80°C .

4.2.3 Dosagem do fator de angiogênese (PIGF e sFlt-1)

A análise quantitativa dos fatores de angiogênese se deu pela técnica de Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), que se baseia no princípio de sanduíche de anticorpos. As substâncias pró e antiangiogênicas, no caso de antígenos, estavam presentes no sangue periférico dessas gestantes desde o primeiro trimestre da gravidez (LEVINE *et al.*, 2004).

Para detecção plasmática do PIGF e sFlt-1 livres foram utilizados kits *DuoSet* ELISA comercial e *Quantikine* ELISA, respectivamente, ambos da *R&D Systems*. A relação sFlt-1/PIGF foi calculada conforme o resultado do quociente entre os dois valores. A sensibilidade dos kits para detecção do sFlt-1 foi de 31,2 pg/mL e do PIGF, mínima de 7,0 pg/mL.

4.2.4 Técnica de dosagem

Do material estocado a -80 graus foram retiradas as amostras identificadas com a sigla alfa/número e colocadas em gelo seco para transporte até o Laboratório de Angiogênese do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. As amostras foram descongeladas sob resfriamento e então processadas.

4.2.5 Dosagem do fator de crescimento placentário PIGF e do sFlt-1

A dosagem do PIGF iniciou-se adicionando o anticorpo específico a uma microplaca estéril para ensaio de ELISA. Criou-se, dessa forma, uma superfície sólida de anticorpos. Essa é a fase de sensibilização da placa com anticorpos específicos. O excesso de anticorpo foi removido por lavagens padronizadas e um reagente bloqueador foi adicionado à placa.

O kit *Quantikine* (*R&D Systems*) utilizado para detecção do sFlt-1 no plasma se difere do Kit *Duaset* por já conter anticorpos específicos de detecção do antígeno

incorporado à superfície dos poços na placa de ELISA. O processo de dosagem torna-se mais ágil e simplificado.

As etapas seguintes são semelhantes para os dois kits (*DuoSet* ELISA e *Quantikine* ELISA).

Nas placas sensibilizadas com anticorpos adicionou-se o plasma no qual estava o antígeno que se desejava quantificar. Ocorreu então a ligação dos antígenos com os anticorpos. Outro anticorpo ligado a uma enzima foi capaz de detectar a reação anterior (anticorpo/antígeno), completando-se o “sanduíche” de ELISA. O substrato dessa enzima foi adicionado aos poços da placa e a reação enzimática que se processou exibiu coloração amarelada, com intensidade proporcional à quantidade da reação.

Finalmente, verificou-se novamente mudança na coloração para alaranjada, ao adicionar solução paralisante da reação à base de ácido. A intensidade dessa cor foi mensurada no leitor de ELISA.

4.2.5.1 Sensibilização da placa de ELISA para detecção de PIGF

No primeiro dia foi selecionada placa padronizada com 96 poços para ensaio de ELISA. Essa placa foi sensibilizada com 100 µL por poço de solução contendo anticorpo de captura do PIGF. A placa foi vedada, colocada em caixa escura e úmida a 4°C (geladeira) e incubada *overnight*.

Para o preparo do anticorpo de captura foi usada a solução de estoque do kit – 180 mg/mL de mouse anti-human VEGF e 720 mg/dL de mouse anti-human PIGF reconstituída em solução de PBS (1,0 mL), conforme protocolo do kit, para atingir a concentração de 4,0 mg/mL PIGF em 10 mL de solução salina tamponada Phosphate buffered saline (PBS) (cloreto de sódio - NaCl a 137 mM; cloreto de potássio - KCl a 2,7 mM; fosfato disódium do hidrogênio - Na₂HPO₄ a 8,1mM; hidrogenofosfato de potássio - KH₂PO₄ a 1,5 mM; água deionizada 1.000 mL).

4.2.5.2 Segunda etapa do ensaio para detecção de PIGF: bloqueio

No dia seguinte, todo o conteúdo dos poços foi desprezado e, em seguida, iniciado o processo de lavagem com 100 mL/poço de tween 20. O processo de lavagem foi padronizado em cinco vezes, usando-se pipeta multicanal.

Depois, foram colocados em cada poço 300 µL de tampão de bloqueio. A placa foi vedada e incubada por uma hora em temperatura ambiente. Após esse tempo, o conteúdo da placa foi retirado e novas lavagens foram realizadas.

- Tween 20 (polioxietilensorbitano monolaurato_Synth_ cód.T1038).
- Tampão de bloqueio (solução de PBS estéril com BSA 1% - albumina serum bovina).

A) Adição das amostras nas placas para detecção do PIGF e SFlt-1, formação do padrão e do branco

As amostras foram descongeladas e usadas sem processo de centrifugação ou diluição. À placa foram adicionados o branco, a curva-padrão e as amostras em duplicata, nesta ordem, e incubada *overnight* a 4°C.

4.2.5.3 Terceira etapa do ensaio: detecção e revelação

Na última fase do ensaio desprezou-se o conteúdo das placas. Após lavagens sucessivas, adicionou-se em cada placa o anticorpo de detecção da reação, já ocorrida entre o antígeno da amostra e o anticorpo da placa, finalizando o chamado “sanduíche” de ELISA. Esse processo ficou em incubação por aproximadamente uma hora. Em seguida, o conteúdo dos poços das placas foi aspirado. Seguiram-se novas lavagens, com solução de *Tween* 20.

A enzima empregada foi estreptovidina e o substrato o o-fenilenodiamina hidrocloreídrico (OPD), Sigma, que dá cor amarelada à placa, num período não superior a 20 minutos. A reação foi paralisada com o tampão ácido de citrato/fosfato. Foi realizada leitura em leitor de microplaca de ELISA, em absorbância, num comprimento de onda de 492 nm. A conversão de absorbância para pg/mL foi obtida por meio da média aritmética da somatória das absorbâncias.

A curva-padrão do ensaio do sFlt-1 e a do PIGF tiveram correlação de 0,997 e 0,98, respectivamente, com a curva-padrão do *kit*.

4.2.6 Diagnóstico de pré-eclâmpsia

Durante o seguimento às gestantes, foi averiguada a existência de pré-eclâmpsia, conforme critérios da National High Blood Pressure Education Programs Working Group (*NHBPEPWG*, 2000). Segundo essa classificação, hipertensão gestacional é definida como pressão arterial sistólica e diastólica $\geq 140/90$ mmHg e proteinúria ≥ 300 mg em amostra de urina de 24 horas ou teste de fita positivo em urina aleatória e sem evidência de infecção do trato urinário.

Nas gestantes hipertensas crônicas, o diagnóstico de pré-eclâmpsia teve como embasamento o aumento ou surgimento de proteinúria, aumento súbito e piora da pressão arterial com proteinúria ou desenvolvimento de sinais e sintomas de pré-eclâmpsia após 20 semanas ou anormalidades laboratoriais características da síndrome (QUADRO 1).

4.2.7 Medida da pressão arterial

A pressão arterial foi mensurada segundo protocolo da Maternidade: paciente assentada por pelo menos cinco minutos, emprego do esfigmomanômetro tipo coluna de mercúrio (marca BD®) colocado no braço esquerdo, com utilização do método auscultatório.

A determinação do limite superior e inferior da pressão sanguínea foi obtida pela identificação do I e V sons de *Korotkoff* (BROWN *et al.*, 2001). A pressão arterial sistólica teve marco no surgimento do primeiro som e a diastólica no desaparecimento do som, durante a desinsuflação do manguito de pressão. Para compor uma das bases do diagnóstico de pré-eclâmpsia, foi considerada pressão arterial maior ou acima de 140/90 mmHg após 20 semanas de gestação. O aumento da pressão arterial foi confirmado numa segunda medida com intervalo de pelo menos quatro horas (NHBPEPWG, 2000).

A pressão arterial média foi calculada em dois momentos neste estudo: na inclusão das gestantes na coorte e no final da gravidez, quando é aferida a PA das gestantes na Maternidade.

Empregou-se a fórmula pressão arterial média = (pressão sistólica + 2 pressões diastólicas) 1/3, segundo Roberts (1999):

$$PAM = (PS + 2PD) / 3$$

4.2.8 Mensuração da proteinúria

Nas avaliações qualitativas, quando a gravidade do caso não permitiu a coleta quantitativa em 24 horas, amostra de urina foi colhida no momento da admissão e testada quanto à existência de proteinúria, pela fita medidora. Considerou-se positiva a leitura superior a uma cruz (≥ 300 mg/dL).

Nas avaliações quantitativas, amostra de urina foi colhida por 24 horas, sob orientação da enfermagem, segundo protocolo da Maternidade, considerando-se para diagnóstico de proteinúria na pré-eclâmpsia valores acima de 0,3 gramas.

QUADRO 1

Classificação dos estados hipertensivos na gravidez

<p>Hipertensão arterial crônica:</p> <p>Pressão alta anterior à gestação de qualquer etiologia: essencial; renovascular; suprarrenal; e aquela diagnosticada pela primeira vez na gestação e sem remissão no pós-parto.</p>
<p>Pré-eclâmpsia:</p> <p>Síndrome específica do período gestacional, determinada pelo aumento da pressão após 20 semanas e proteinúria.</p>
<p>Pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Agravamento súbito dos níveis pressóricos em gestantes hipertensas bem-controladas. - Proteinúria em gestantes hipertensas. - Agravamento súbito da proteinúria em gestantes hipertensas previamente proteinúricas. - Trombocitopenia e elevação de enzimas hepáticas.
<p>Hipertensão gestacional:</p> <p>Mulheres que tiveram níveis pressóricos elevados diagnosticados pela primeira vez durante a gravidez e sem proteinúria. Esse diagnóstico é transitório até que apareçam outros sinais da síndrome da pré-eclâmpsia ou a pressão arterial elevada persista após o parto confirmando a quadro de hipertensão crônica.</p>

Fonte: *National High Blood Pressure Education Program Working Group (2000).*

4.2.9 Análise dos fatores de angiogênese e do doppler das artérias uterinas

Os fatores de angiogênese e a persistência de incisura bilateral nas artérias uterinas foram analisadas no momento da formação da coorte (grupo A e grupo B) e nos subgrupos que se formaram no final do estudo.

Observou-se a formação de diferentes subgrupos conforme os níveis da pressão arterial e presença de proteinúria no final do estudo. Algumas gestantes permaneceram normotensas enquanto outras tiveram elevação da pressão arterial com proteinúria, caracterizando a pré-eclâmpsia. Um terceiro subgrupo, com 14 gestantes, teve pressão arterial elevada, mas sem proteinúria detectada ou mensurada e foram excluídas da análise final.

4.2.9.1 Análise da concentração dos fatores de angiogênese nas gestantes dos grupos A e B e na predição dos subgrupos formados

Os fatores de angiogênese (PIGF, sFlt-1 e relação sFlt-1/PIGF) foram quantificados somente no momento da inclusão das gestantes na coorte, em uma única dosagem no plasma, a partir do segundo trimestre da gravidez, caracterizando o tipo de estudo transversal.

O resultado quantitativo da concentração sérica desses fatores de angiogênese foi analisado no grupo A (normotensas) e comparado com as gestantes do grupo B (hipertensas crônicas). Outra análise foi da capacidade desses fatores de angiogênese em prever pré-eclâmpsia a partir do segundo trimestre da gravidez, numa fase assintomática da doença.

4.2.9.2 Análise da persistência de incisura bilateral nas gestantes do grupo A e B e na predição dos subgrupos formados

A persistência de incisura bilateral nas artérias uterinas foi analisada a partir do segundo trimestre da gravidez quanto à sua frequência (absoluta e relativa) no momento da inclusão das gestantes na coorte e nos subgrupos que se formaram no final do estudo.

4.2.10 Curvas ROC

A curva ROC foi obtida ao selecionar-se um diagrama interativo com cálculo automático de sensibilidade e especificidade

A área sob a curva ROC (AUC) foi determinada para avaliar a acuidade individual dos fatores de angiogênese em prever pré-eclâmpsia a partir do segundo trimestre da gravidez. O grupo de gestantes que ficaram normotensas foi considerado “controle” em relação àquelas que desenvolveram pré-eclâmpsia. As áreas sobre a curva ROC dos fatores de angiogênese e do doppler foram comparadas para definir a acurácia desses preditores de PE nessa coorte.

4.2.11 Determinação do *cutoff* para o PIGF, sFlt-1 e relação sFlt-1/PIGF

Ao determinar o melhor *cutoff* para o PIGF, sFlt-1 e relação sFlt-1/PIGF, considerou-se o valor da maior sensibilidade, determinada pela curva ROC. Em seguida, as características do resultado de cada fator de angiogênese e do doppler (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, razões de verossimilhança e risco relativo) foram calculadas e comparadas entre si, para determinar o melhor preditor de PE nesse grupo específico de gestantes (TAB. 7).

Em seguida, o *cutoff* de cada fator de angiogênese foi associado à incisão bilateral, em série e em paralelo, para verificar o benefício dessa associação na predição da pré-eclâmpsia (TAB. 8 e 9).

4.3 Análise estatística

4.3.1 Cálculo amostral

Trata-se de estudo transversal no qual uma coorte de gestantes com risco de pré-eclâmpsia foi analisada no segundo trimestre da gravidez e observada até o momento do parto. A amostra foi estimada em mais de 52 pacientes, com relação 4:1. Empregou-se o programa *EpilInfo* versão 2002, modelo *Stacalc.Exe*, com os seguintes parâmetros: Erro α : 90%, erro β : 20%, semelhante ao estudo de CHAIWORAPONGSA, 2005, no intervalo da idade gestacional semelhante ao nosso estudo.

4.3.2 Análise das variáveis

Para análise da significância entre variáveis de distribuição anormal, empregou-se o teste não paramétrico da mediana *Kruskal-Wallis* test. O nível de significância aceitável foi de $p < 0,05$. As características comparativas das gestantes que compuseram a coorte estão descritas na TAB. 2.

A concentração de PIGF e sFlt-1 no plasma das gestantes dos grupos A e B no momento da inclusão no estudo foi analisada pelo teste de *Kruskal-Wallis*. Esse mesmo teste foi empregado para investigar a possível diferença de concentrações dos fatores de angiogênese no segundo trimestre nas gestantes que mais tarde desenvolveram PE ou permaneceram normotensas.

A análise dos dados foi executada empregando-se o programa *MINITAB® Release14- statistical software*, versão 14.20 de 2005.

4.3.3 Método para determinação de AUC

As áreas sob as curvas ROC foram automaticamente reveladas utilizando-se o programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 15.0. Desta forma, o desempenho dos fatores de angiogênese e a persistência da incisura bilateral foram avaliados quanto à acurácia em predizer pré-eclâmpsia.

4.3.4 Cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo

Para cálculo da acuidade dos fatores de angiogênese e da incisura bilateral na predição de pré-eclâmpsia foi utilizada a tabela 2x2 do programa *Epi Info*, versão 3.5 de 2008.

O benefício da associação dos fatores de angiogênese com incisura bilateral foi avaliado em série e em paralelo, nesse mesmo programa.

O teste qui-quadrado foi utilizado para avaliar a probabilidade de haver associação entre os fatores de angiogênese e a ocorrência de pré-eclâmpsia:

- PIGF e pré-eclâmpsia, $p < 0,001$;
- sFlt-1 e pré-eclâmpsia, $p = 0,02$;
- relação sFlt-1/PIGF e pré-eclâmpsia, $p = 0,01$.

Considerando o tamanho da amostra e o valor numérico da frequência esperada ser inferior a cinco na tabela 2x2, obteve-se o valor de significância da associação dos fatores de angiogênese com a incisura bilateral na predição a PE, de forma isolada e associada, em série e em paralelo, pelo teste exato de Fisher.

5 RESULTADOS

A análise dos dados foi realizada em 71 gestantes que finalizaram a coorte e a pré-eclâmpsia ocorreu em 12 (17%) delas, sendo sete (28%) do grupo B e cinco (10%) do grupo A. Mais da metade das gestantes, 45 (63%), continuou normotensa no momento do parto.

Dados clínicos das gestantes que compuseram os subgrupos de gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia no final da gravidez e a diferença comparativa entre elas, além das características maternas e fetais, o resultado da incisura bilateral e os níveis da pressão arterial estão na TAB. 3.

TABELA 3

Dados clínicos das pacientes e dos recém-nascidos no final da gravidez

Características básicas	Total n	Normotensas n=45 mediana	Pré-eclâmpsia n=12 mediana	Valor p*
Características maternas				
Idade (anos)	57	22,00	27,50	0,08
Paridade	57	1,0	2,0	0,11
Grupo A	43	38 (83)	5(10)	0,03
Grupo B	14	7(28)	7(28)	***
Raça n(%)				
Branca	20	17(85)	3(15)	0,08**
Não branca	37	28(76)	9(24)	0,49**
IB n(%)				
	11	4(36)	7(64)	0,03**
Pressão arterial (mmHg)				
PAS	57	110,0	155,0	<0,001
PAD	57	70,00	100,00	<0,001
PAM	57	87,00	121,50	<0,001
Características do parto				
IG parto (sem)	57	38,00	36,50	0,001
Peso RN (gr)	57	2965	2548	0,07
Apgar 1 minuto	57	8,0	7,0	0,255

IG: idade gestacional, grupo A (normotensas), grupo B (hipertensas), IB: incisura bilateral; PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica. PAM: pressão arterial média, RN: recém-nascido* *Kruskal-Wallis test*. **p: χ^2 analysis.

5.1 Doppler das artérias uterinas

A distribuição da persistência da incisura nas artérias uterinas estão demonstradas nas tabelas 4 e 5, abaixo:

TABELA 4
Distribuição das pacientes dos grupos A e B
conforme resultado do doppler das artérias uterinas

Pacientes	n=71 (%)	IB presente	IB ausente
		11(15,5)	60 (84)
Grupo A	n=46 (%)	6 (13)	40 (87)
Grupo B	n=25 (%)	5 (20)	20 (80)

IB: Incisura bilateral $p=0,46$ (*Kruskal-Wallis test*)

Em todas as gestantes foi realizado o doppler das artérias uterinas. A incisura bilateral estava presente em 11 (15,5%) delas. Na TAB. 4 estão demonstradas as frequências numéricas e as percentagens das gestantes que compuseram o grupo A (normotensas) e o grupo B (hipertensas crônicas). A análise comparativa da distribuição quantitativa da presença ou ausência de incisura nas artérias uterinas no momento da inclusão das gestantes no estudo não foi estatisticamente diferente ($p=0,46$).

TABELA 5
Resultado do exame do doppler das artérias uterinas ao final da gravidez

Pacientes	IB presente	IB ausente
	n(%)	n(%)
Número de pacientes n=57	11 (19)	46 (81)
Normotensas n=45	4 (8,9)	41 (91)
Pré-eclâmpsia n=12	7 (58,3)	5(41,6)

IB: incisura bilateral, $p=0,03$ (*Kruskal-Wallis test*).

A TAB. 5 salienta a distribuição numérica e percentual da presença ou ausência de incisura bilateral nas gestantes da coorte no final da gravidez. Das 11 incisuras, mais da metade permaneceu no grupo das gestantes que tiveram pré-eclâmpsia (58%). No entanto, quatro incisuras (8,9 %) foram registradas nas gestantes que permaneceram normotensas. A análise estatística da distribuição final da incisura bilateral nas gestantes que tiveram pré-eclâmpsia em relação às normotensas foi significativamente diferente ($p=0,03$).

As catorze gestantes que foram excluídas da análise final de predição de pré-eclâmpsia não apresentavam incisura bilateral nas artérias uterinas.

5.2 Representação gráfica das concentrações dos fatores de angiogênese no segundo trimestre da gravidez

5.2.1 Concentração sérica materna do PIGF nos grupos A e B

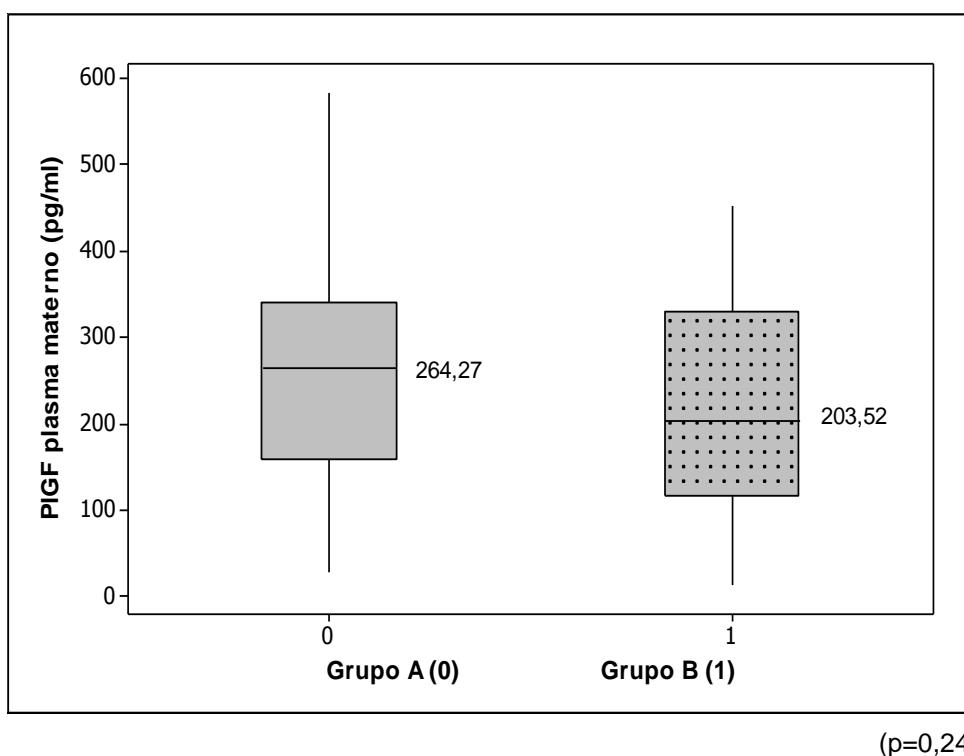
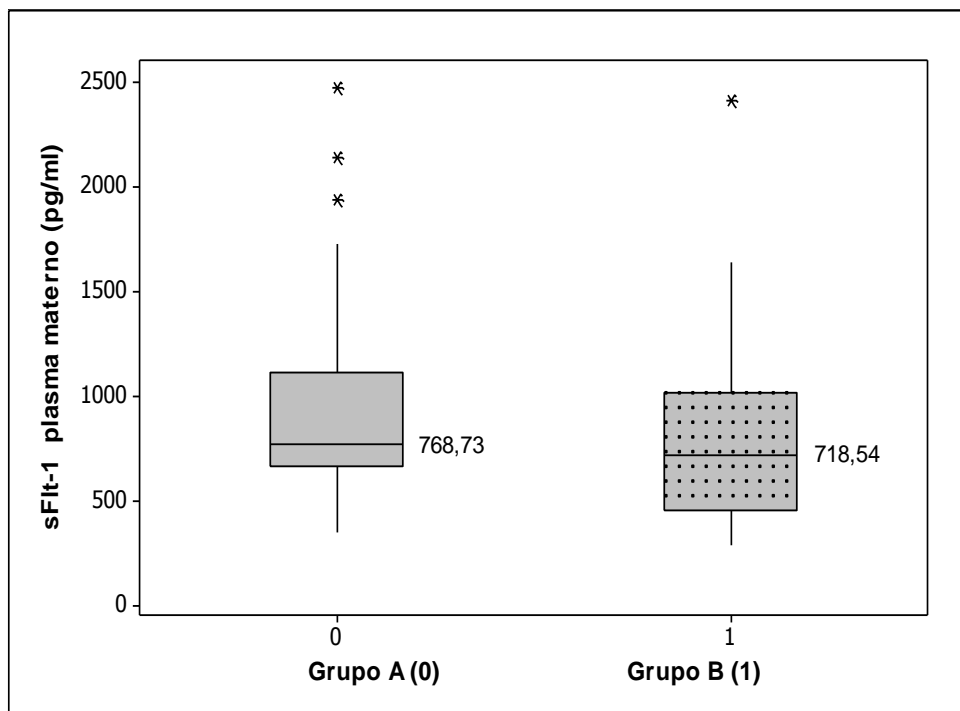


GRÁFICO 1 - Representação por caixas do PIGF (pg/mL) nas gestantes normotensas(0) e nas hipertensas crônicas(1).

As concentrações no plasma do PIGF (pg/mL) das gestantes dos grupos A e B estão representadas no GRÁF. 1. As caixas representam os limites dos intervalos interquartílicos (25 e 75) e o traço interno, a mediana. A caixa com pontilhado significa as gestantes hipertensas crônicas (grupo B).

O teste *Kruskal-Wallis* utilizado mostrou que a concentração plasmática do PIGF foi de 264,3 e 203,5 (pg/mL) nas gestantes dos grupos A e B, respectivamente. Esses valores não eram significativamente diferentes (p=0,245).

5.2.2 Dosagem sérica materna do receptor solúvel tirosina kinase (sFlt-1) nos grupos A e B



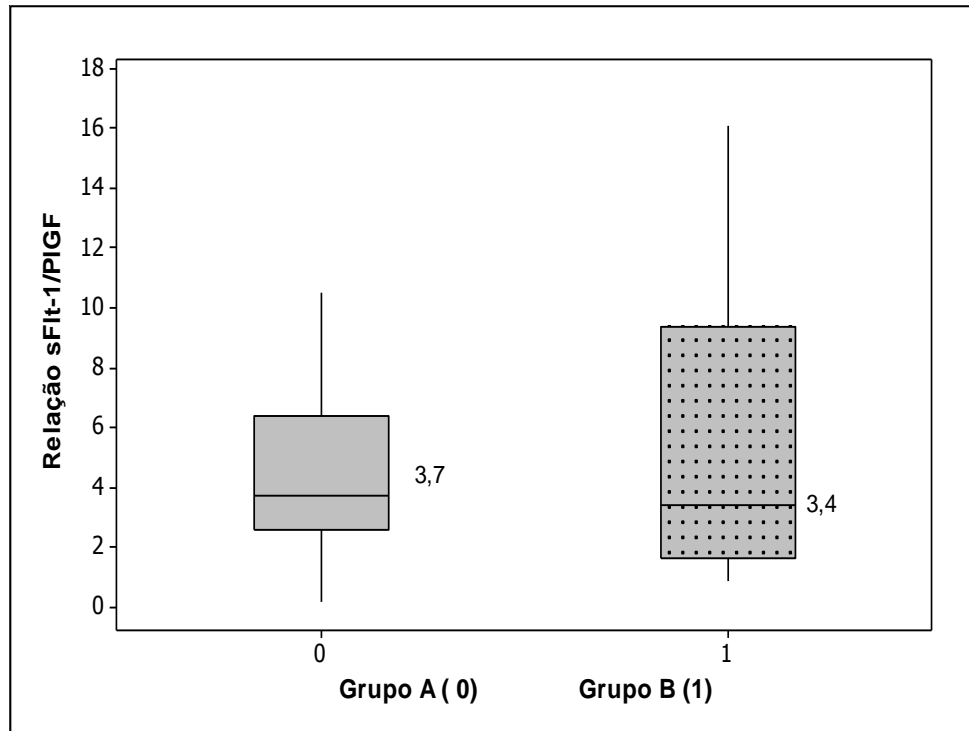
($p=0,27$).

GRÁFICO 2 - Representação por caixas do sFlt-1 (pg/mL) nas gestantes dos grupos A e B no segundo trimestre da gravidez.

O GRÁF. 2 de caixas representa a concentração plasmática do receptor solúvel tirosina quinase (sFlt-1) no momento da inclusão das gestantes na coorte. A concentração do sFlt-1 foi de 768,7 vs 718,5 (pg/mL) nas gestantes normotensas e hipertensas crônicas, respectivamente. A relação entre as medianas das concentrações séricas do sFlt-1 não foi diferente entre os grupos ($p=0,268$).

A diferença entre as medianas dos dois grupos, o intervalo interquartil e os outliers estão representados no GRÁF. 2.

5.2.3 Caixas da relação sFlt-1/PIGF nos grupos A e B



(p=0,63)

GRÁFICO 3 - Representação por caixas da relação sFlt-1/PIGF nas gestantes dos grupos A e B.

O valor numérico da relação sFlt-1/PIGF nas gestantes do grupo A e nas gestantes hipertensas crônicas, grupo B, não foi estatisticamente diferente (3,7 vs 3,4, respectivamente, $p=0,630$).

5.2.4 Representações gráficas das concentrações dos fatores de angiogênese no segundo trimestre da gravidez em relação aos eventos encontrados no final do estudo

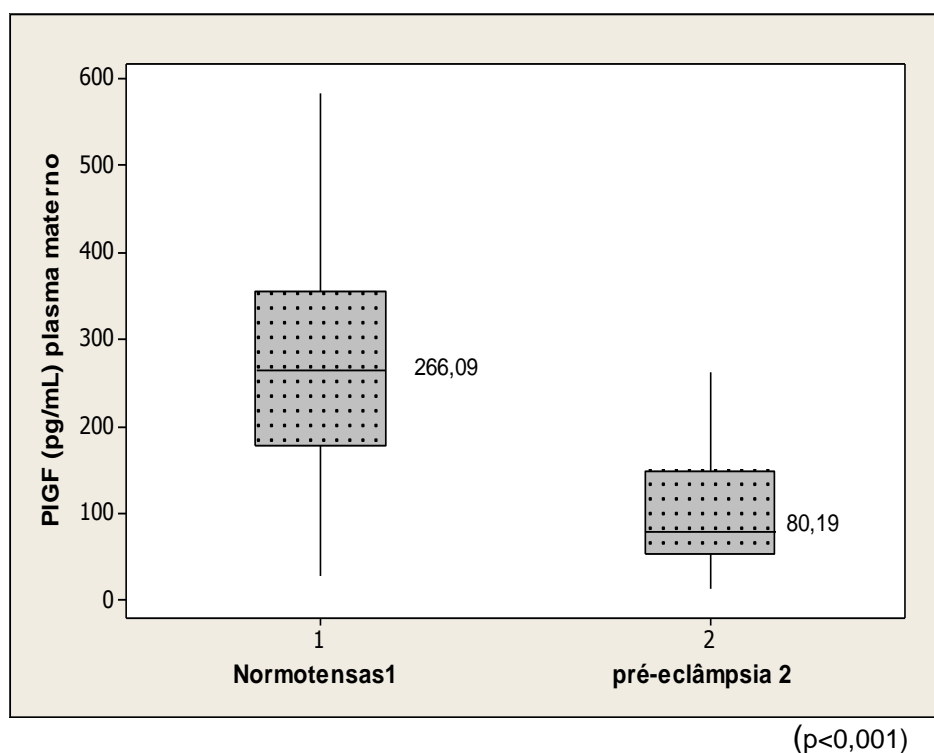
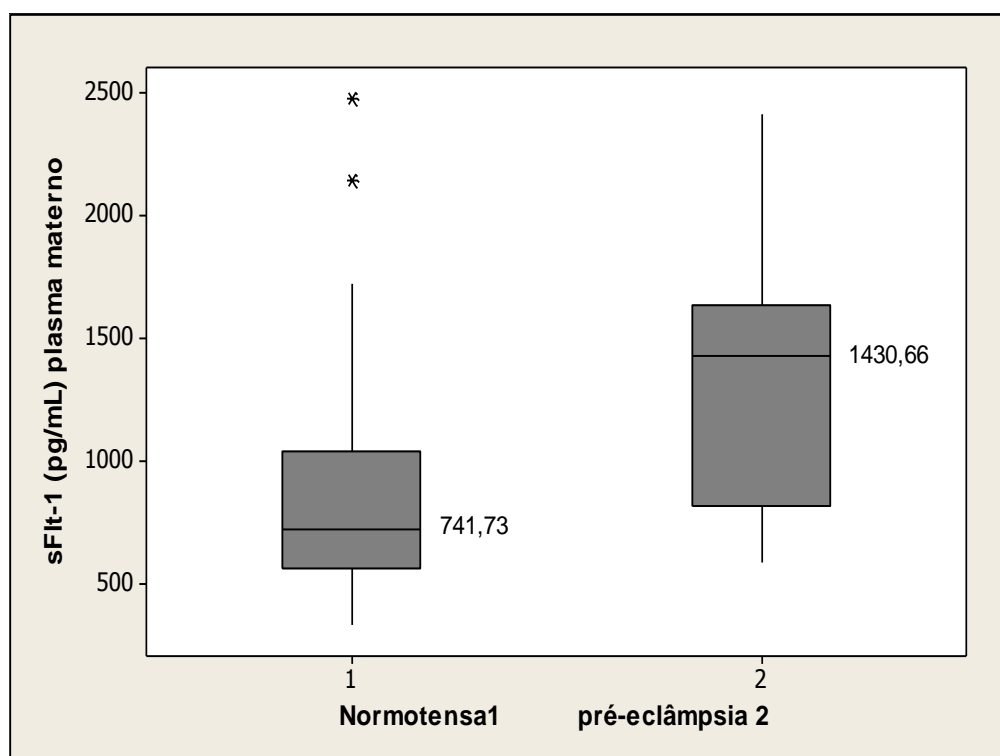


GRÁFICO 4 - Representação por caixas da concentração do PIGF (pg/mL) no segundo trimestre da gravidez, nos grupos de gestantes que se formaram no final da gravidez.

A concentração sérica do PIGF foi significativamente diferente no segundo trimestre da gravidez, nos grupos de gestantes que se formaram no final do estudo ($p < 0,001$). As gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia apresentaram mais baixas concentrações plasmáticas de PIGF em relação ao grupo das normotensas e hipertensas sem proteinúria. A concentração no plasma do PIGF naquelas com pré-eclâmpsia foi aproximadamente três vezes menor em relação à das gestantes normotensas.

As medianas da concentração do PIGF (pg/mL) nas normotensas foi de 266,09 vs 80,19 na pré-eclâmpsia, $p < 0,001$.



(p=0,003)

GRÁFICO 5 - Representação por caixas das concentrações do sFlt-1 (pg/mL) no segundo trimestre em relação ao evento final da gravidez.

O GRÁF. 5 representa o intervalo interquartílico, a mediana, o valor máximo e mínimo do sFlt-1 (pg/mL) no segundo trimestre da gravidez. O teste de significância entre as medianas mostra que já havia diferença na concentração desse fator entre as gestantes que mais tarde permaneceram normotensas ou desenvolveram PE (741,73 vs 1.430,66 pg/mL, respectivamente, p=0,003).

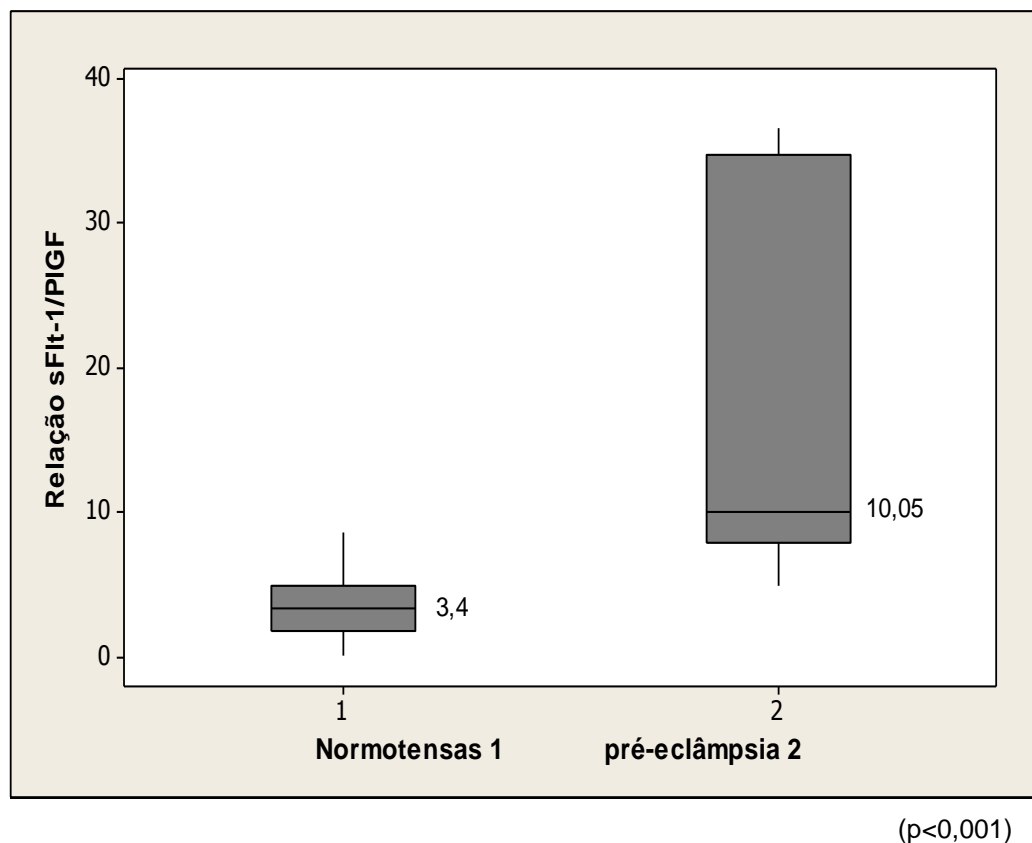


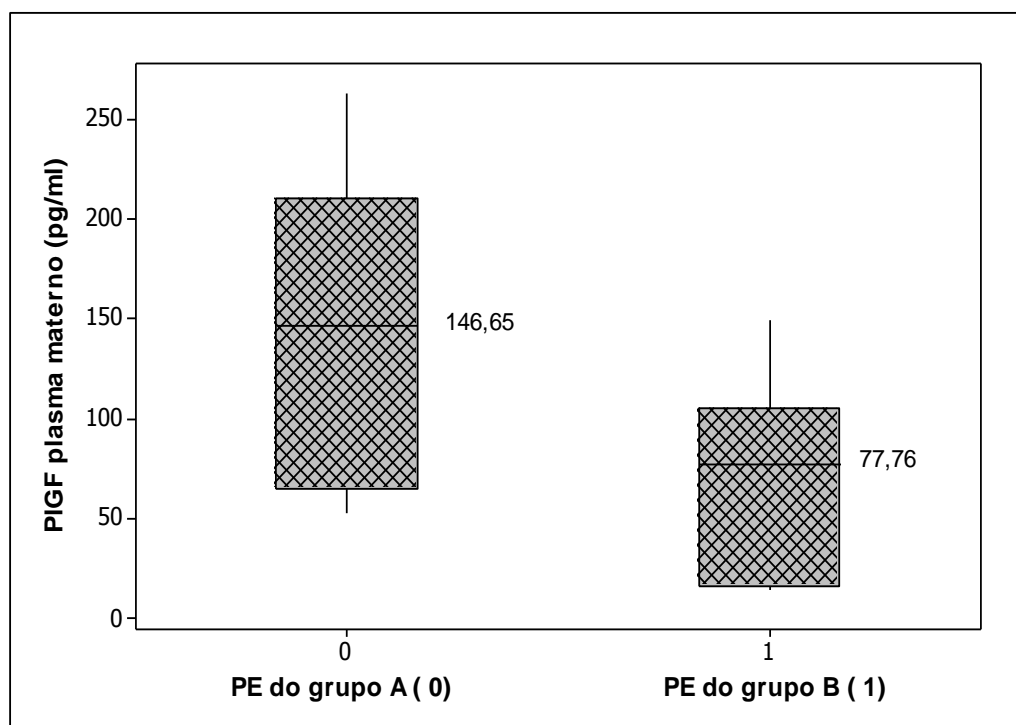
GRÁFICO 6 - Representação por caixas da relação sFlt-1/PlGF no segundo trimestre em relação aos eventos clínicos no final da gravidez.

O GRÁF. 6 exibe a diferença no resultado numérico da relação entre sFlt-1 e PlGF entre os grupos formados na internação para o parto ($p<0,001$).

O resultado quantitativo da relação sFlt-1/PlGF nas gestantes que permaneceram normotensas foi estatisticamente diferente daquelas que evoluíram para a pré-eclâmpsia (3,40 vs 10,05). O teste de significância das medianas mostra que elas são diferentes ($p<0,001$).

5.2.5 Análise dos fatores de angiogênese quanto à origem da pré-eclâmpsia

Os GRÁF. 7 a 12 demonstram as concentrações dos fatores de angiogênese, PIGF e sFlt-1 em relação à origem da pré-eclâmpsia.

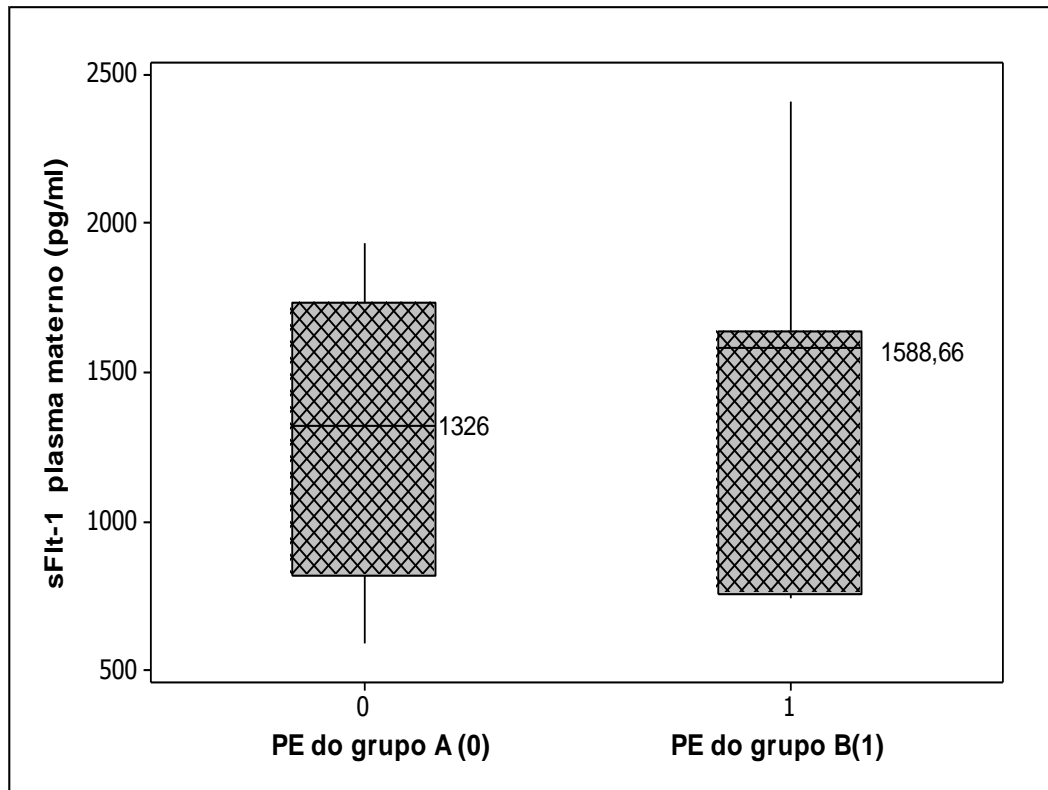


($p=0,19$)

GRÁFICO 7 - Dosagem sérica do PIGF (pg/mL) nos subgrupos de gestantes com PE.

A primeira caixa representa a concentração do PIGF (pg/mL), no segundo trimestre da gravidez, da pré-eclâmpsia que se originou das gestantes que eram do grupo A; e a segunda caixa a PE das gestantes do grupo B.

A análise dos valores das medianas para o PIGF manteve baixa concentração no grupo das normotensas e grupo das hipertensas crônicas (146,65 vs 77,76 pg/mL, respectivamente, $p=0,19$) que desenvolveram pré-eclâmpsia no final da gravidez.



(p=0,685)
GRÁFICO 8 - Dosagem sérica do sFlt-1 na pré-eclâmpsia dos grupos A e B.

A análise dos valores das medianas para o sFlt-1 (pg/mL) não foi diferente na pré-eclâmpsia das gestantes normotensas (grupo A) em relação às hipertensas crônicas (grupo B) - (1.326 vs 1.566,66 pg/mL, respectivamente, p=0,685).

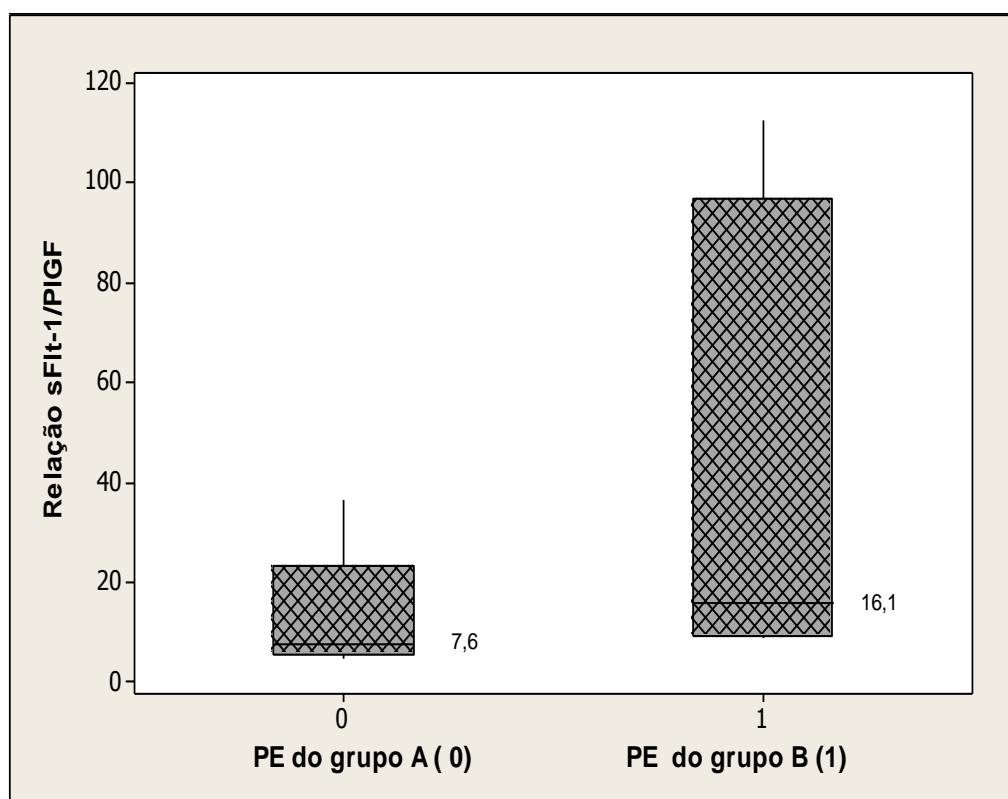


GRÁFICO 9 - Cálculo da relação dentre o sFlt-1 pelo PIGF na pré-eclâmpsia de origem dos grupos A e B.

Não houve diferença ao analisar-se a relação numérica da relação sFlt-1/PIGF entre toda pré-eclâmpsia originada do grupo das gestantes normotensas em relação à que se originou do grupo de hipertensas. Para cálculo estatístico da diferença entre os dados, utilizou-se o *Kruskal-Wallis* test considerando-se a distribuição não paramétrica. A relação sFlt-1/PIGF foi de 7,6 na PE do grupo A e de 16,1 nas gestantes do grupo B ($p=0,122$).

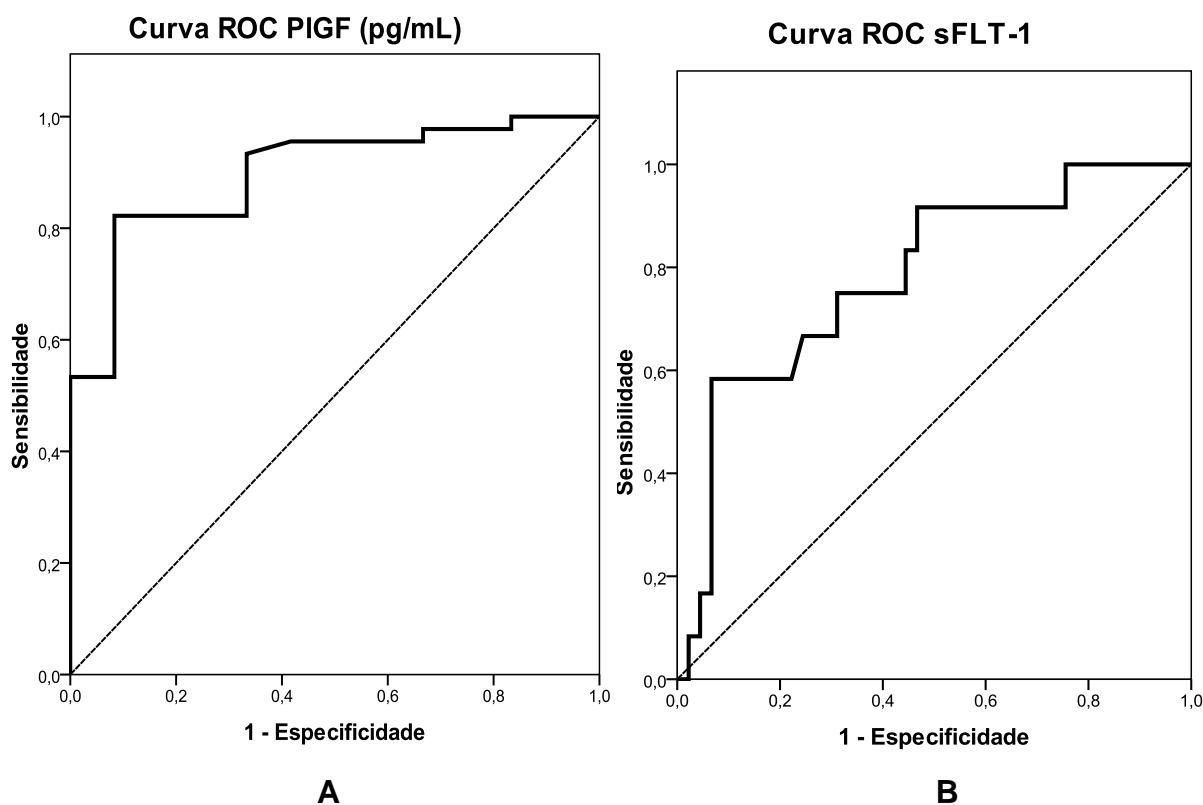


GRÁFICO 10 - Curvas ROC do PIGF, sFlt-1 e da relação sFlt-1/PIGF

O GRÁF. B mostra a área sob a curva ROC para o PIGF. A análise dessa curva indica que esse marcador tem boa acuidade em prever pré-eclâmpsia. O valor numérico foi bem acima da linha diagonal, que representa uma relação de acaso. O valor numérico da área sob a curva ROC do PIGF foi de 0,90.

Da mesma maneira foi gerada pelo programa SPSS 2008 a curva ROC para o sFlt-1. No caso desse marcador, a área sob a curva ROC foi menor que a do PIGF, no entanto, a acuidade de predição manteve-se elevada, 0,80.

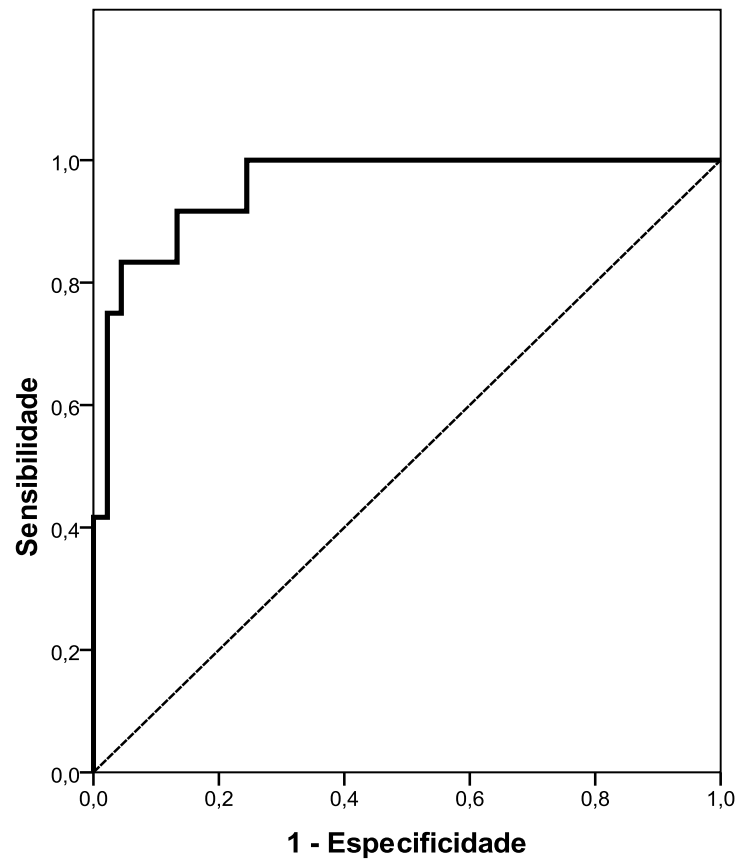


GRÁFICO 11 – Curva ROC sFlt-1/PIGF.

O poder discriminatório da relação sFlt-1/PIGF, ou seja, a acurácia global dessa relação, foi mensurado a partir do cálculo da área sob as curvas ROC. O mais alto valor numérico foi obtido dessa relação (TAB. 6).

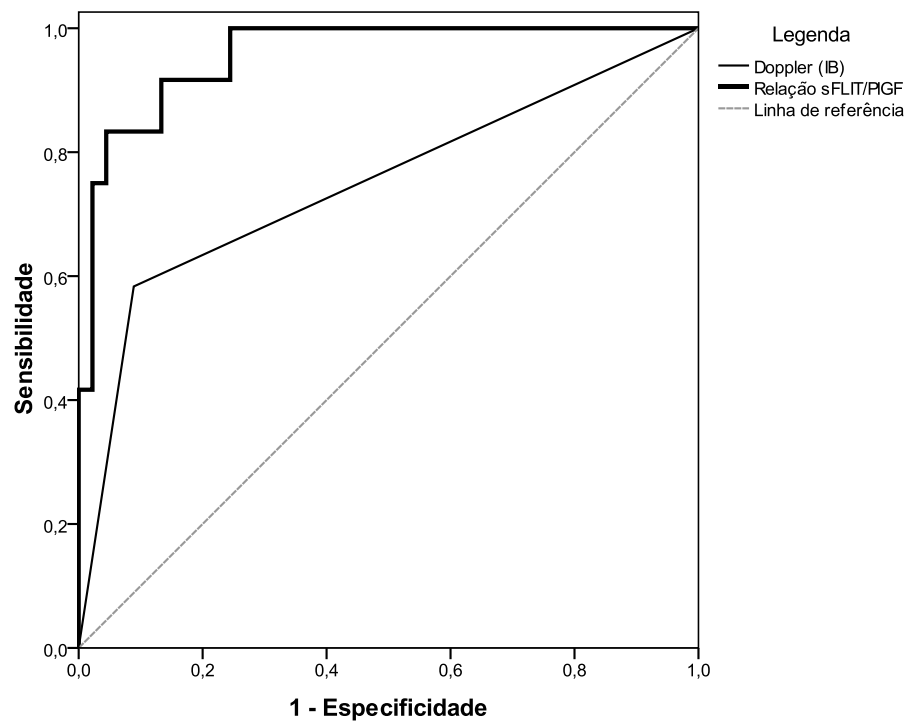


GRÁFICO 12 – Curva ROC doppler X relação sFlt-1/PIGF.

A área sobre a curva ROC do doppler das artérias uterinas (IB) e da relação sFlt-1/PIGF está representada no mesmo gráfico, para dar melhor visibilidade da acuidade desses testes em predizer pré-eclâmpsia.

TABELA 6
 Descrição das áreas sob as curvas ROC para os fatores de
 angiogênese e o doppler das artérias uterinas

Parâmetros analisados	Área sob a curva
Doppler (IB)	0,74
PIGF	0,90
sFlt-1	0,80
sFlt-1/PIGF	0,95

A área sob a curva ROC para os parâmetros analisados está demonstrada na TAB. 6. Em geral, todos os marcadores apresentaram área sob a curva ROC acima da linha de referência, sendo as maiores áreas para a relação sFlt-1/PIGF e em seguida para o PIGF.

5.2.6 Tabelas da acuidade do doppler e dos fatores de angiogênese em predizer pré-eclâmpsia

TABELA 7
 Teste da acuidade do doppler das artérias uterinas e dos fatores de angiogênese
 na predição de pré-eclâmpsia

Parâmetros	n	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	LR+	LR-	RR (IC)
IB x PE	57	58,3	93,2	63,6	91,7	8,6	0,4	7,6 (2,9-19,8)
PIGF Cutoff \leq 159,5	57	91,7	82,2	57,9	97,4	5,2	0,1	22 (3-158)
sFlt-1 Cutoff \geq 927,06	57	75	64,4	36	90,6	2,1	0,4	3,8 (1,2-13)
sFlt-1/PIGF Cutoff \geq 4,9	57	100	75,6	52,2	100	4	0	***
sFlt-1/PIGF Cutoff \geq 5,4	57	91,7	77,8	52,4	97,2	4,1	0,1	19 (2,6-136)

IB: incisura bilateral, PE: pré-eclâmpsia, S: sensibilidade, E: especificidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, LR+: *Likelihood positive ratio*, LR-: *Likelihood negative ratio*, RR: risco relativo.

A TAB. 7 mostra a sensibilidade e especificidade do doppler das artérias uterinas (incisura bilateral) e dos fatores de angiogênese, determinados pela curva ROC. A acuidade do doppler das artérias uterinas foi determinada utilizando-se a tabela 2x2 do programa *Epi info*. A partir da maior sensibilidade para o PIGF (ponto de corte $\leq 159,5$ pg/mL), para o sFlt-1 (ponto de corte $\geq 927,06$ pg/mL) e para a relação sFlt-1/PIGF (ponto de corte $\geq 4,9$) foi calculada a acuidade desses fatores de angiogênese em predizer pré-eclâmpsia (TAB. 8). A acuidade em predizer PE também foi calculada para a relação sFlt-1/PIGF (ponto de corte $\geq 5,4$) onde a sensibilidade encontrava-se abaixo de 100%.

TABELA 8

Teste em paralelo da acuidade do doppler e dos fatores de angiogênese na predição de pré-eclâmpsia

Parâmetros	n	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	LR+	LR-	RR (IC)
IB e/ou PIGF Cutoff $\leq 159,5$	57	100	86,7	66,7	100	7,5	0	***
IB e/ou sFlt-1 Cutoff $\geq 927,06$	57	75	60	33,3	90	1,8	0,42	3,3(1,0-11,0)
IB e/ou sFlt-1/PIGF Cutoff $\geq 4,9$	57	100	71,1	48	100	3,4	0	***
IB e/ou sFlt-1/PIGF Cutoff $\geq 5,4$	57	92	77,7	52,3	97,2	4,3	0,11	18,9(2,6-136)

IB: incisura bilateral, S: sensibilidade, E: especificidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, LR+: *Likelihood positive ratio*, LR-: *Likelihood negative ratio*, RR: risco relativo.

A TAB. 8 registra a sensibilidade e a especificidade da associação em paralelo, ou seja, ao mesmo tempo a persistência de IB nas artérias uterinas e alterações nos fatores de angiogênese. A acuidade dessa modalidade de associação foi calculada a partir da tabela 2x2, no segundo trimestre da gravidez.

TABELA 9
 Teste em série da acuidade do doppler e dos fatores de angiogênese
 e na predição de pré-eclâmpsia

Parâmetros	n	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	LR+	LR-	RR (IC)
IB e PIGF Cutoff $\leq 159,5$	11	100	50	78	100	2	0	***
IB e sFlt-1 Cutoff $\geq 927,06$	11	85,7	50	75	67	1,8	0,3	2,2 (0,43-11,7)
IB e sFlt-1/PIGF Cutoff $\geq 4,9$	11	100	50	78	100	2	0	***
IB esFlt-1/PIGF Cutoff $\geq 5,4$	11	100	50	78	100	2	0	***

IB: incisura bilateral, IC: intervalo de confiança, S: sensibilidade, E: especificidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, LR+: *Likelihood positive ratio*, LR-: *Likelihood negative ratio*, RR: risco relativo.

Na TAB. 9 apuram-se a sensibilidade, a especificidade e a acuidade em predizer pré-eclâmpsia da associação em série, quando utilizado primeiro o doppler das artérias uterinas e, em seguida, os pontos de corte nos quais os fatores de angiogênese se encontram alterados no segundo trimestre da gravidez. Nessa modalidade de associação a sensibilidade máxima esteve presente em quase todos os pontos de corte utilizados. O primeiro ponto de corte da relação sFlt-1/PIGF $\geq 5,4$, primeiro abaixo na curva ROC, também foi analisado e manteve a sensibilidade de 100%. A realização do doppler das artérias uterinas seguido da dosagem dos fatores de angiogênese afasta em 100% a probabilidade do desenvolvimento de pré-eclâmpsia.

6 DISCUSSÃO

A prevalência da pré-eclâmpsia em geral é baixa e varia conforme a população estudada (2 a 25%). Entretanto, a dúvida quando ao momento do surgimento da doença e a imprevisibilidade de sua evolução faz dela a maior ameaça à vida reprodutiva da mulher. Tendo em vista a inexistência de tratamento específico para a pré-eclâmpsia, a interrupção da gravidez com a retirada do tecido placentário é a terapêutica definitiva em todos os casos, elevando as taxas de complicações obstétricas (SIBAI; DEKKER; KUPLERMING, 2005). Assim, os estudos focados em predição da pré-eclâmpsia se intensificaram nas últimas décadas, com a finalidade de isolar-se um marcador sensível, de fácil aplicabilidade, não invasivo, viável economicamente e que possa ser empregado na prática clínica de forma a captar gestantes de risco durante o acompanhamento pré-natal (MEADS *et al.*, 2008a).

Ao buscar preditores específicos de pré-eclâmpsia, foram considerados os benefícios e impactos da seleção acurada de todas as gestantes, independentemente do risco materno. Nesta casuística, as gestantes tinham fatores de risco diferentes para pré-eclâmpsia e como conhecido a incidência da doença varia (DUCKITT; HARRINGTON, 2005). Algumas eram primigestas, outras hipertensas crônicas e parte delas tinham história de pré-eclâmpsia anterior. O fato de trabalharmos com grupos heterogêneos quanto ao risco de PE no presente trabalho (primigestas 2% e hipertensas crônicas 25%) se deu na expectativa de encontrarmos um único marcador que pudesse ser utilizado de rotina no pré-natal dessas gestantes.

Neste desenho de estudo as gestantes que tiveram PE anterior e que ficaram normotensas foram agrupadas às primigestas, formando o grupo A. As hipertensas com bom controle pressórico, usando ou não terapia anti-hipertensiva, foram agrupadas e formaram o grupo B. Pesquisa prévia demonstrou também que o doppler é melhor que fatores de risco epidemiológicos maternos na predição de pré-eclâmpsia (ZIMMERMANN *et al.*, 1997).

É de conhecimento amplo que a incidência de PE varia conforme a presença de fatores de risco epidemiológico, biofísico e bioquímico. Durante o pré-natal a associação de biomarcadores aumenta a acuidade preditiva na seleção de pacientes propensas a desenvolver pré-eclâmpsia (ESPINOZA *et al.*, 2007; MADAZLI *et al.*, 2005). Estudos que propuseram comparar variáveis epidemiológicas e biofísicas de risco de PE enfatizaram que o doppler de uterinas sobrepõe-se aos fatores de risco materno na predição de pré-eclâmpsia (PAPAGEORGHIS *et al.*,2005). Yu *et al* em 2005 realizaram estudo de regressão logística usando como variáveis alteração do doppler de artérias uterinas e fatores de risco materno na predição de PE e encontraram que a história materna de risco de PE por si só aumenta a incidência da pré-eclâmpsia em relação às gestantes de risco habitual, mas a associação entre as variáveis apresentou melhores resultados. A área sob a curva ROC para fatores de risco materno combinado ao doppler de uterinas foi de 0,83, maior que a área encontrada para o doppler de uterinas (0,78) e fatores maternos isolados (0,72).

Fato importante no presente estudo, foi que a prevalência de incisura bilateral se distribuir sem diferença estatística nas pacientes que compuseram o grupo A (normotensas) em relação às gestantes do grupo B (hipertensas) , mostrando que o agrupamento dessas gestantes não influenciou no achado de anormalidade no doppler das artérias uterinas.

Papageorghiou *et al.* (2005) realizaram estudo multicêntrico com participação do Brasil com o objetivo de estimar o impacto do risco de pré-eclâmpsia durante a gravidez. Nessa investigação, fatores de risco como doença hipertensa crônica na gravidez e gestantes com pré-eclâmpsia prévia e doppler de artérias uterinas (IB e/ou IP) foram analisados na 23ª semana de gravidez. A área sob a curva ROC obtida para a associação da história materna com doppler de artéria uterina foi maior do que com marcadores isolados.

Foi preciso captar ativamente algumas gestantes no pré-natal de risco habitual, em especial as primigestas saudáveis. As demais gestantes pertenciam ao pré-natal de alto risco e foram incluídas no momento da realização do doppler de artérias uterinas, conforme protocolo do pré-natal. Para compor esta amostra, empregou-se o programa *Epi-info*, considerando-se a chance de encontrar alteração dos fatores de angiogênese no intervalo da idade gestacional desse estudo, de acordo com estudo observacional de Chaiworapongsa *et al.* (2005). Lim *et al.* (2008), avaliando um grupo de 140 mulheres, encontrou odds ratio de 6,8 quando níveis de sFlt-1 estavam aumentados no plasma de gestantes com PE em relação às normotensas. Das gestantes selecionadas no início do estudo, 71 foram analisadas no final da gravidez. Foram ao todo sete perdas. Algumas gestantes não foram localizadas para obtenção de informações sobre o resultado do parto, outras gestantes tiveram partos em diferentes cidades e amostras de plasma foram perdidas no processo de descongelamento.

A idade gestacional da seleção das gestantes desta pesquisa ocorreu a partir do segundo trimestre da gravidez. Estudos sobre o impacto econômico do uso de métodos de rastreamento de pré-eclâmpsia durante o pré-natal estabelece como critério de seleção apenas avaliações em que a idade gestacional encontra-se igual ou abaixo de 25 semanas (MEADS *et al.*, 2008a). No nosso meio é comum a entrada tardia de muitas das gestantes no pré-natal e por isso um marcador de risco de complicações na gravidez deve atender a essa realidade, contrária ao ideal, que é a inserção precoce das gestantes no acompanhamento. O pré-natal é critério de qualidade no atendimento à gestante e tem, entre outros objetivos, selecionar e encaminhar gestantes de risco e fazer diagnóstico de pré-eclâmpsia, evitando-se, assim, agravamentos dos quadros clínicos iniciais.

Na nossa casuística, o doppler das artérias uterinas foi realizado entre 23 e 31 semanas de gestação (mediana de 26,3 semanas). A idade máxima de 31 semanas cronológicas não foi excluída, em especial devido à persistência de incisura bilateral nessa gestante. Certificou-se que o intervalo entre a realização do doppler e o parto foi superior a cinco semanas, afastando-se, assim, a existência de PE no momento da inclusão dessa gestante. O tempo ideal para

screening com doppler de artérias uterinas é entre 22 e 26 semanas de gravidez (GUZMAN; KONTOPOULOS; ZALUD, 2005).

Foi utilizado um desenho de estudo transversal de predição de pré-eclâmpsia, em que o doppler das artérias uterinas e a concentração dos fatores de angiogênese foram realizados uma só vez, no segundo trimestre da gravidez em gestantes de risco não selecionados. A maioria dos estudos de predição de pré-eclâmpsia é longitudinal retrospectivo ou caso-controle realizados em amostras de sangue armazenadas por até mais de uma década (BAUMANN *et al.*, 2008; LEVINE *et al.*, 2004; TAYLOR *et al.*, 2003; UNAL *et al.*, 2007). Outros são multicêntricos, com elevado número de gestantes compondo as amostras, nos quais as perdas de casos influenciam pouco nos resultados obtidos (SIBAI *et al.*, 2008; VATTEN *et al.*, 2007).

O doppler das artérias uterinas foi realizado em todas as gestantes. A persistência de incisura bilateral nas artérias uterinas $\geq 26^{\text{a}}$ semana de gestação foi o critério utilizado para considerar o exame alterado. A análise qualitativa da incisura protodiastólica é método rastreador utilizado como marcador de alteração placentária, conforme protocolo do Hospital das Clínicas no período deste estudo, por acumular ao longo dos anos mais experiência técnica na sua classificação. Estudos de revisão sistemática também informam que a incisura bilateral é um dos critérios de alteração do doppler com maior amostragem de gestantes estudadas (CNOSSEN *et al.*, 2008).

A análise quantitativa da incisura bilateral foi método proposto em estudos anteriores (AARDEMA *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2000), porém a comparação entre análise qualitativa e quantitativa parece não melhorar seu valor como marcador de alteração placentária (BOWER; KINGDOM; CAMPBELL, 1998). A maneira de se mensurar a incisura protodiastólica e a criação de diferentes escores para uso clínico varia entre os autores (AARDEMA *et al.*, 2000). No entanto, é inquestionável a relação entre a profundidade da queda sistólica e as formas mais graves e precoces de pré-eclâmpsia e/ou CIUR (PARK *et al.*, 2000).

Por considerar-se a idade gestacional ≤ 26 semanas como limite de normalidade para IB, alguns exames realizados antes dessa idade gestacional foram repetidos. A idade gestacional para o rastreamento de PE utilizando o doppler de uterinas em muitos estudos é inferior à do presente trabalho (MEADS *et al.*, 2008a; PARK *et al.*, 2005; PLASENCIA *et al.*, 2007), mas a repetição do doppler quando há persistência de incisura nas artérias uterina aumenta o valor preditivo para resultados adversos na gravidez (CAMPBELL *et al.*, 2000; SCHWARZE *et al.*, 2005).

Estudos mostram que há benefício em realizar o doppler na segunda metade do segundo trimestre da gravidez, mesmo considerando que estudos recentes limitam a idade gestacional na 25 semanas de gestação e que em fases ainda mais precoces como 17/18 semanas já se pode prever pré-eclâmpsia principalmente na sua forma precoce e grave. No entanto outros estudos mostram benefício da repetição do Doppler de forma seriada até a 28 semana de gravidez. (CHAN *et al.* 1995). Outro fato importante é que quase metade das anormalidades encontradas na 24^a semana de gravidez desaparecia entre 28 e 34 semanas e somente a persistência de alterações tardias relaciona-se a piores resultados na gravidez. A incisura bilateral foi o achado tardio com menos probabilidade de desaparecer e em que os piores resultados perinatais foram encontrados (SOREGAROLI *et al.*, 2001).

Nessa coorte encontrou-se incisura bilateral em 11 (19%) das 71 gestantes e a incidência de pré-eclâmpsia foi de 17%. A incisura bilateral foi um bom marcador de predição de PE, como revelado pelo valor da área sob a curva ROC (0,74). A sensibilidade de 58,3% e especificidade de 93,2% também se encontram dentro do esperado comparado a estudos de predição de pré-eclâmpsia. Revisão sistemática sobre a acurácia de métodos de predição de pré-eclâmpsia salientou que em estudos cuja incidência da doença é acima de 4%, a incisura bilateral tem sensibilidade variando entre 27 e 63% e especificidade entre 80 e 94% (MEADS *et al.*, 2008a).

Encontrou-se VPP de 63% para predição de PE quando as artérias uterinas estavam alteradas e esse valor é mais alto que os achados de revisões publicadas. Os estudos são consistentes quanto à grande variação do VPP e à baixa sensibilidade do doppler das artérias uterinas na predição de PE. No entanto, sua alta especificidade e VPN quase assegura ausência de complicações na gravidez. Nesse sentido, nossos dados sobre o doppler de artérias uterinas são compatíveis quanto ao VPN encontrado de 89%. Abdala e Harrington (2005) revisaram 14 estudos sobre o valor preditivo do doppler para PE em população não selecionada e revelaram variação no VPP de 7 a 31% e intervalo de 76 a 99% para o VPN. Na revisão sistemática de Clossen, o estudo que considerou incisura bilateral isolada na predição de PE teve VPP de 13% e VPN de 99%.

Encontrou-se o valor de verossimilhança positiva de 6,5 e negativa de 0,5 na predição de PE quando presente a IB no segundo trimestre da gravidez. Esse achado se assemelha à revisão sistemática de Clossen, em que foram incluídos 17 estudos de IB com 36.969 mulheres e o resultado para o LR+ foi de 6,5 (4,3-8,7) e LR- de 0,6 (0,44-0,79) (MEADS *et al.*, 2008a). Coleman, McCowan e North (2000) apuraram LR+ de 5,6 e LR- de 0,4 avaliando 116 gestantes com alteração no doppler de uterinas. Espinoza *et al.* (2007), com casuística de 3.296 grávidas, acusaram LR+ de 6,9 e LR- de 0,3 usando como parâmetro de anormalidade IB e/ou IP \geq percentil 95 para idade gestacional.

A associação de outros índices do doppler, como a incisura bilateral, tem sido usada para aumentar o valor preditivo do doppler, que é baixa, em geral, mas na população de alto risco essa predição é melhor, principalmente nos casos de PE precoce (CONDE-AGUDELO; ROMERO; LINDHEIMER, 2009). Tem sido sugerida para o rastreamento de resultados adversos nas gestantes a associação dos índices do doppler das artérias uterinas. Na gravidez de baixo risco a associação IB e IP rastreia a maioria das gestantes que mais tarde desenvolvem pré-eclâmpsia; e nas gestantes de alto risco, a IB isolada ou IB com ou sem aumento do IP tem sido sugerida como melhor associação no rastreamento de complicações, ambos os testes no segundo trimestre da gravidez (CNOSSEN *et*

al., 2008; CONDE-AGUDELO; ROMERO; LINDHEIMER, 2009; PAPAGEORGHIOU *et al.*, 2005).

Os estudos sobre o valor do doppler de artérias uterinas como preditor de complicações na gravidez ainda estão em vigência. Há necessidade de se padronizar metodologia e determinar se existe benefício da associação de índices do doppler e em qual trimestre da gravidez sua eficácia aumenta. Nas últimas décadas, muitos marcadores bioquímicos presentes no sangue materno têm sido investigados como preditores de PE, de forma isolada ou associada ao doppler de artérias uterinas.

As substâncias angiogênicas possuem características específicas que fazem delas importantes marcadoras de alteração endotelial de gravidade e por se alterarem no plasma antecedendo a PE devem ser investigadas durante o pré-natal. O balanço angiogênico tem sido descrito nos achados patogênicos das gestantes com PE (KARUMANCHI; EPSTEIN, 2007). No nosso estudo mensuraram-se o PIGF e sFlt-1 pelas evidências do seu envolvimento na gênese da PE e pela sua capacidade preditiva durante a gravidez (ESPINOZA *et al.*, 2007; KUSANOVIC *et al.*, 2009; MAYNARD *et al.*, 2003; PAPAGEORGHIOU *et al.*, 2005; POLLIOTTI *et al.*, 2003; WATHEN *et al.*, 2006).

A concentração do PIGF e do sFlt-1 estava alterada no segundo trimestre nas gestantes que mais tarde desenvolveram pré-eclâmpsia. Quando se comparou a concentração do sFlt-1 e do PIGF entre as gestantes que formaram o grupo A (normotensas) e o grupo B (hipertensas), observou-se que não houve diferença estatística. Portanto, esse agrupamento inicial para compor os grupos A e B não se relacionou aos fatopres de angiogênese e como já dito anteriormente, fato semelhante ocorreu com a incisura bilateral.

Os níveis séricos maternos do PIGF estavam três vezes mais baixo nas gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia em relação às normotensas e essa diferença foi estatisticamente significativa (PIGF pg/mL 266,09 vs 80,19, respectivamente, $p < 0,001$). Esse comportamento do PIGF antecedendo um evento clínico reforça

os dados da literatura da importância preditiva dessa proteína angiogênica (LEVINE *et al.*, 2004; NOORI *et al.*, 2010).

Dados das publicações mostram variação quantitativa na concentração sérica do PIGF no sangue materno durante a gravidez. Sibai *et al.* (2008), em seu estudo multicêntrico incluindo gestantes brasileiras, detectaram níveis de PIGF de 495,0 e 609,0 pg/mL nas gestantes que desenvolveram PE, em relação às normotensas, acima da 26 semanas cronológicas e essa diferença foi estatisticamente significativa. A técnica utilizada nesse estudo, *Beckman Coulter*, foi diferente da técnica de ELISA empregada em nossa pesquisa e essa diferença pode ter influenciado no valor quantitativo dos fatores de angiogênese mensurados no plasma.

Utilizamos *kits* diferentes para a dosagem dos fatores de angiogênese pelo método de ELISA. Para a mensuração PIGF usou-se o *Duoset* e para dosagem do sFlt-1 o *Quantikine*, ambos da *R&D systems*. Anteriormente, realizou-se investigação com dosagem de fatores de angiogênese na gravidez com essa mesma técnica empregada, quando substâncias angiogênicas foram isoladas no plasma de gestantes com pré-eclâmpsia. Contou-se com a experiência acumulada do Laboratório de Angiogênese com essa prática de ELISA.

Pesquisas que empregaram técnicas de dosagem semelhantes a esta enfatizam semelhança quantitativa nos valores séricos dos fatores de angiogênese. Usando *kits* da *R&D systems* para dosagem de PIGF e sFlt-1, estudos retrospectivos realçaram que a chance de desenvolver PE a termo aumentou sete vezes quando os níveis de PIGF se encontravam diminuídos, abaixo de 231 pg/mL (VATTEN *et al.*, 2007). A mediana dos valores séricos do PIGF de 85,3 pg/mL foi semelhante à encontrada no nosso estudo entre gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia (UNAL *et al.*, 2007).

Em outro estudo retrospectivo usando técnica de sanduíche de ELISA o PIGF foi dosado no sangue materno pelo *kit* da *R&D system*, entre 27 e 30 semanas, e o valor numérico foi superior ao encontrado no presente trabalho, em torno de 300

pg/mL na PE e em torno de 700 pg/mL no controle. As amostras de plasma foram armazenadas por dois anos e esse tempo foi semelhante ao tempo em que nossas amostras ficaram congeladas no laboratório de Medicina Fetal. Embora haja semelhanças quanto à idade gestacional e à técnica da dosagem, a população selecionada apresentava características diferentes. Trabalhou-se com grupo heterogêneo, não selecionado de risco de PE enquanto o outro estudo foi composto somente por primigestas. Além disso com número de amostra se diferiu nos dois estudos (TAYLOR *et al.*, 2003).

Levine *et al.* (2004) descreveram a curva de normalidade do PIGF e do sFlt-1 prévio a pré-eclâmpsia. A concentração do PIGF livre no intervalo entre 25 e 28 semanas encontrava-se abaixo de 600 pg/mL nas gestantes que desenvolveram PE tardio e próximo de 700 pg/mL nas que permaneceram normotensas; e essa diferença foi significativa. A concentração de sFlt-1 estava aumentada mais tarde na gravidez, a partir do terceiro trimestre da gravidez e do intervalo de 33 a 36 semanas, acima da mediana das gestantes do nosso grupo, que foi de 26 semanas de gravidez.

Como foi mostrado anteriormente, há grandes variações quantitativas dos fatores de angiogênese no plasma das gestantes durante a gravidez e esse fato pode ser devido à falta de padronização metodológica. Existem variações entre autores no tempo de armazenamento das amostras, na técnica de dosagem e na idade gestacional em que são selecionadas as gestantes para estudo de predição. Além disso a incidência e gravidade da PE varia na presença de fatores de risco materno e na presença de alteração ao Doppler de uterinas. Estudo anterior realizado em nossa área de pesquisa mostrou que os fatores de angiogênese também se correlacionaram com a gravidade da pré-eclâmpsia (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

A concentração do sFlt-1 nas gestantes desta pesquisa na idade gestacional de 26 semanas (mediana), naquelas que no final da gravidez desenvolveram pré-eclâmpsia, estava duas vezes aumentada em relação às que permaneceram

normotensas (741,73 vs 1.430,66 - pg/mL, respectivamente) e essa diferença foi estatisticamente diferente ($p=0,003$).

A mediana da idade gestacional na qual se apurou que o sFlt-1 estava aumentado e o PIGF diminuído se deu em torno da 26 semanas de gravidez, e foi semelhante ao intervalo proposto por Moore Simas *et al.* (2007), cuja curva do perfil do sFlt-1 aumentou a partir do intervalo de 17 a 26 semanas gestacionais. Essa idade gestacional aproximada de 26 semanas pode ser a ideal no rastreamento da PE, uma vez que no primeiro trimestre da gravidez o sFlt-1 parece não ser bom preditor para uso clínico. Seu aumento ocorrer de forma acentuada a partir o primeiro/segundo trimestre da gravidez e por isso parece se relacionar ao dano endotelial sistêmico e a resposta vascular materna de hipertensão arterial reativa. Além disso, houve queda na concentração do sFlt-1 no pós-parto, fato que reforça a relação dessas moléculas com a placenta (POWERS *et al.*, 2004).

Muller *et al.* (2006), ao analisar esses mesmos fatores de angiogênese o doppler de artérias uterinas (IP e/ou IB), não observaram associação entre eles e concluiu que são variáveis independentes. A idade gestacional do seu estudo foi inferior à aqui registrada, com média de 18 semanas e por isso seu resultado pode ter sido diferente do nosso.

Para estudo de predição de pré-eclâmpsia, Madazli *et al.* (2005) selecionaram 122 gestantes normotensas e com risco de PE na idade gestacional entre 21 e 26 semanas no momento da realização do doppler de uterinas, que foi considerado alterado se a relação fosse $A/B > 2,6$. Entre outras substâncias dosadas no plasma materno, o PIGF encontrava-se estatisticamente reduzido, diferenciando o grupo de gestantes que desenvolveram PE; e foi o melhor preditor de pré-eclâmpsia quando comparado a outros marcadores. Para *cutoff* de 90 pg/mL, a sensibilidade do PIGF foi de 92,9%, a especificidade de 94% e o valor preditivo positivo de 68%. O doppler de artérias uterinas empregando o critério de $A/B > 2,6$ teve VPP baixo, de 17,2%, embora a alta capacidade do doppler de excluir falso-negativo tenha se mantido alto - 100%.

Portanto a idade gestacional parece interferir na concentração de fatores de angiogênese no plasma (SIBAI; DEKKER; KUPLERMINC, 2005; THADHANI *et al.*, 2004).

No final da avaliação obtivemos 13 (18%) casos de prematuridade com menos de 37 semanas, sendo que dois RNs nasceram antes de 34 semanas. A maioria dos partos (58, 72%) ocorridos nessa coorte foi acima de 37 semanas. A mediana geral da idade gestacional do grupo de gestantes que desenvolveu PE foi de 36,5 semanas. Nos estudos de Levine *et al.* (2004) as gestantes também tiveram parto mais tardio e as alterações dos fatores de angiogênese foram usadas na predição de nascimento a termo ou pretermo.

No nosso estudo, as complicações da gravidez e neonatais foram poucas e insuficientes para análise estatística de predição usando fatores maternos, doppler de artérias uterinas e fatores de angiogênese. Houve uma morte intrauterina, em gestante de 41 anos, hipertensa crônica controlada com medicamento, melanoderma e, apesar dos exames de rotina de vitalidade fetal preconizados no *Pan-American Resources* (PNAR) terem sido realizados, essa fatalidade não pôde ser evitada.

Nosso resultado se difere do achado do estudo realizado por Sibai e col (2008) onde foram incluídas gestantes brasileiras (Sibai *et al.*, 2008). Encontramos que os fatores de angiogênese foram preditores de PE no segundo trimestre da gravidez em gestantes com risco aumentado para PE. A diferença metodológica pode ter influenciado nos resultados encontrados. Para cálculo do melhor ponto de corte, partiu-se da maior sensibilidade gerada pela curva ROC para determinar-se a acuidade desses marcadores em predizer pré-eclâmpsia. Levou-se em consideração o fato de a PE ser doença grave e de baixa prevalência e por isso um exame mais sensível deveria detectar mais alto número de casos para acompanhamento e selecionar gestante num universo amplo para testes mais específicos.

O fato de encontrarmos a concentração dos fatores de angiogênese sem diferença significativa nas gestantes que compuseram o grupo A em relação ao grupo B e já haver diferença no segundo trimestre da gravidez nas gestantes que mais tarde desenvolveram pré-eclâmpsia, independente de fatores de risco epidemiológico, mostram o valor dessas proteínas como preditoras da pré-eclâmpsia.

Ainda há questionamento quanto ao emprego clínico dos fatores de angiogênese como rastreadores de pré-eclâmpsia e em qual momento da gravidez. Revisão sistemática publicada por Widmer *et al.* (2007), questiona a recomendação desses marcadores de angiogênese como teste de *screening*, devido às diferentes metodologias empregadas. Os principais fatores limitantes são a diferença na idade gestacional selecionada, o tipo de população estudada, o tempo de armazenamento das amostras e os diferentes resultados encontrados. Acredita-se que longos períodos de armazenagem das amostras de sangue possam deteriorar os fatores de angiogênese (RANA *et al.*, 2007).

A associação do doppler aos marcadores de angiogênese PIGF e sFlt-1 no plasma materno no nosso modelo de estudo teve o propósito de selecionar com mais acuidade biomarcadores na predição da PE em gestantes de risco não selecionado. Ao analisar-se o grupo das 14 gestantes que se formaram no final do estudo e que apresentavam hipertensão arterial sem definição clara de proteinúria, verificou-se que a incisura nas artérias uterinas estava ausente em todas no momento da inclusão. Também os fatores de angiogênese não estavam alterados nessas gestantes em relação às gestantes normotensas. (ANEXO- 2).

A análise comparativa das medianas do PIGF (pg/mL) nas gestantes normotensas em relação às hipertensas sem proteinúria foi de 266,70 vs 273,38, respectivamente, $p=0,628$. A concentração do sFlt-1 não diferenciou, no segundo trimestre da gravidez, as gestantes que continuaram normotensas das que apresentaram pressão alta na gravidez, sem proteinúria ($p=0,268$). O valor resultante da relação sFlt-1/PIGF nas gestantes que permaneceram normotensas não foi estatisticamente diferente daquelas que tiveram pressão arterial elevada, sem proteinúria (3,45 vs 2,50 $p=0,083$).

Na verdade, as informações sobre o valor preditivo dos fatores de angiogênese em gestantes com hipertensão arterial crônica são raras e por isso há necessidade de mais pesquisas nesse grupo de gestantes. Levando-se em consideração a normalidade do doppler, dos fatores de angiogênese e a hipertensão no final da gravidez sem proteinúria bem-definida, essas gestantes foram excluídas na análise estatística que avalia a predição da PE. Elas não apresentavam quadro clínico de normalidade nem tinham critério de pré-eclâmpsia conforme protocolo utilizado (*NHBPWEP*, 2000). O diagnóstico de pré-eclâmpsia é examinador dependente e nesse estudo, os dados do resultado da gravidez foi colhido em prontuário arquivado, nos leitos do préparto e na enfermaria de alto risco da maternidade do Hospital das Clínicas.

Levine *et al.* (2006b), referiram um grupo de gestantes com hipertensão gestacional, sem proteinúria, com ausência ou modesta elevação de proteínas angiogênicas na circulação. Em outra pesquisa retrospectiva, a comparação entre os níveis de PIGF e sFlt-1 também não foi estatisticamente diferente entre gestantes hipertensas crônicas e normotensas no segundo trimestre da gravidez (*UNAL et al.*, 2007).

É possível inferir que os fatores de angiogênese sejam marcadores específicos de PE. Nos casos das primigestas que tiveram elevação da PA, poder-se-ia estar diante de caso de pré-eclâmpsia, uma vez que a proteinúria de fita não reflete a real perda em 24 horas, no entanto, não se pode descartar hipertensão transitória da gravidez. Um dos fatores limitantes do presente trabalho foi não ter a pressão arterial do puerpério para elucidar esse achado. A maioria das gestantes que compuseram esse grupo era hipertensa crônica na sua origem. A falta de adesão ao tratamento medicamentoso não foi averiguado no momento do parto (dados dos prontuários). Muitas delas tiveram pressão arterial elevada sem caracterizar hipertensão arterial grave.

Na presente investigação, encontrou-se benefício da associação simultânea, principalmente do PIGF e da relação sFlt-1/PIGF, com a persistência de incisura

bilateral na acuidade preditiva da PE. Chama a atenção a sensibilidade máxima isolada da relação sFlt-1/PIGF na predição de PE, além dos altos valores de sensibilidade e especificidade do PIGF isolado no rastreamento da PE, como modelo ideal de teste de rastreamento de doença potencialmente grave. Vale ressaltar que o PIGF se altera numa fase bem precoce da gravidez e talvez seja forte candidato ao uso isolado no pré-natal. Como já referido, um método rastreador deve ser prático, econômico e eficaz para uso clínico.

Por outro lado, os teste de associação em série também se mostraram altamente sensíveis em rastrear PE, partindo do achado de doppler alterado e, em seguida, associando cutoff onde os valores de angiogênese se encontravam alterados. Neste estudo, em especial não foi possível avaliar estatisticamente a associação em série utilizando em primeiro lugar os fatores de angiogênese e logo a seguir o doppler. Na tabela 2x2 encontrou-se numerador zero nessa forma de associação, inviabilizando a análise estatística. Novos estudos com maiores casuísticas poderão preencher lacunas do conhecimento sobre a melhor forma de se associarem biomarcadores de predição.

Há amplas perspectivas do emprego de marcadores da angiogênese placentária na seleção de gestantes com risco de pré-eclâmpsia e também terapêutico após a doença instalada, considerando-se já ser realidade a adoção terapêutica dos inibidores da angiogênese na oncologia (CARMIELIET *et al.*, 2003). Além disso, compreender os mecanismos que controlam a intensa angiogênese placentária nesse curto período de tempo da gestação humana e as alterações desse processo na pré-eclâmpsia pode contribuir para outras áreas da Medicina que de alguma forma lidam com doenças angiogênicas.

Ao lado dessa expectativa promissora de predição precoce de PE, crescem os estudos do uso terapêutico de substâncias angiogênicas durante a gravidez. Em experimentos laboratoriais recentes, a administração do VEGF121 tem revertido quadros de lesão endotelial renal e placentária, por bloquear a ação do sFlt-1, reduzindo também a hipertensão arterial sem causar danos ao embrião. Muito é preciso investigar sobre o papel das proteínas angiogênicas na gênese da PE.

Experimentos realizados em ratas prenhas, geneticamente programadas para desenvolver PE, tiveram seu destino clínico modificado pelo uso de terapia com VEGF121 numa fase precoce da gravidez (WOODS *et al.*, 2011). Num futuro próximo, espera-se que os avanços científicos levem a disponibilizar o uso de fármacos para controle de fatores de angiogênese alterados nas gestantes triadas durante o pré-natal.

A associação da incisura bilateral com fatores de angiogênese tanto em série como em paralelo selecionou todas as gestantes que desenvolveram PE. Como mostram as TAB. 8 e 9, a alteração no doppler de artérias uterinas associada à alteração de PIGF, sFlt-1 e relação sFlt-1/PIGF, no segundo trimestre da gravidez, assegura em quase 100% a ausência de pré-eclâmpsia na gravidez, independentemente da existência de fatores de risco materno. Esse achado pode ser explicado pelas teorias e estudos científicos que mostram a relação das substâncias angiogênicas na invasão trofoblástica e formação vascular placentária e na gênese da lesão endotelial que precede a manifestação clínica de hipertensão e proteinúria.

Em relação ao rastreamento de PE a partir da metade do segundo trimestre, a relação sFlt-1/PIGF mostrou-se o melhor método ajustado de predição de PE. Também os estudos de detecção dessas substâncias angiogênicas na urina são animadores como rastreadores na rotina do pré-natal, pela facilidade de obtenção de amostras. Além disso, sugere-se que as substâncias angiogênicas têm relação com as alterações renais da pré-eclâmpsia, como a endoteliase glomerular e a perda de proteínas na urina (LEVINE *et al.*, 2006b).

Os avanços na técnica de dosagem com o uso de sistema automatizado e rápido de sFlt-1 e PIGF (*Elecsys / Cobas, Roche Diagnostics*) foram investigados para uso na prática clínica em mulheres grávidas que receberam assistência obstétrica no Reino Unido. O impacto econômico dessa ferramenta complementar de diagnóstico foi comparado ao protocolo padrão de acompanhamento de PE quanto à sua sensibilidade e especificidade em classificar melhor as pacientes grávidas. O benefício do seu emprego no rastreamento de PE após 20 semanas

de gestação como um complemento à prática clínica também tem sido avaliado e, embora haja custos adicionais, o teste de dosagem rápida mostra-se promissor, pela sua capacidade em reduzir o diagnóstico falso-positivo (HADKER, 2010).

Finalizando este estudo, tem-se a certeza do quanto é possível melhorar a predição de PE na prática clínica com o uso dos métodos apresentados. Mais pesquisas são necessárias para identificar o momento ideal para o emprego de métodos biofísicos e bioquímicos de predição de resultados adversos na gravidez. Fica como sugestão a análise de outros parâmetros semiquantitativos do doppler associados ao PIGF, que tem sido promissor marcador de PE na fase precoce da gravidez.

7 CONCLUSÃO

Os fatores de angiogênese PIGF, sFlt-1 e a relação sFlt-1/PIGF são marcadores eficazes na predição de pré-eclâmpsia e a associação dessas proteínas angiogênicas com a incisura bilateral acrescentou pouco benefício na acuidade preditiva positiva no segundo trimestre da gravidez.

REFERÊNCIAS

AARDEMA, M.W. *et al.* Quantification of the diastolic notch in Doppler ultrasound screening of uterine arteries. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 16, p. 630-634, 2000.

ABDALLA, M.F.; HARRINGTON, K.F. Prediction and prevention of preeclampsia and IUGR. **Early Human Development**, v. 81, p. 865-76, Sep, 2005.

AHMED, A. *et al.* Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble Flt-1 by oxygen. **Placenta**, London, v. 21, Supp A, n.14, s16-24, Mar-Apr, 2000.

ALBAIGES, G. *et al.* One-stage screening for pregnancy complications by color Doppler assessment of the uterine arteries at 23 weeks' gestation. **Obstet Gynecol**, v. 96, p. 559-64, 2000.

AQUILINA, J. *et al.* Improved early prediction of preeclampsia by combining second-trimester maternal serum inhibin-A and uterine artery Doppler. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 17, p. 477-84, 2001.

AXT-FLIEDNER, R. *et al.* The value of uterine artery Doppler ultrasound in the prediction of severe complications in a risk population. **Arch Gynecol Obstet**, v. 271, p. 53-58, 2005.

BAUMANN, A.U. BERSINGER, N.A.; SURBEK, D.V. Serum markers for predicting pre-eclampsia. **Molecular aspects medicine**, v. 287, p. 277-244, 2007.

BAUMANN, M.U. *et al.* First trimester serum levels of soluble endoglin and soluble fmslike tyrosine kinase-1 as first-trimester markers for late-onset preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 199, p. 266.e1-266.e6, 2008.

BDOLAH, Y. *et al.* Circulating angiogenic proteins in trisomy 13. **Am J Obstet Gynecol**, v. 194, n. 1, p. 239-45, 2006.

BDOLAH, Y.; SUKHATME, V.P.; KARUMANCHI, S.A. Angiogenic imbalance in the pathophysiology of preeclampsia: Newer insights. **Semin Nephrol**, v. 24, p. 548-556, 2004.

BELLAMY, L.; CASA, J.P.; HINORANI, A.D. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 35, n. 7627, p. 974, 2007.

BOLLER, A.; CABRAL, A.C.V. Dopplerfluxometria das artérias uterinas na avaliação do prognóstico materno. **J Bras Ginecol**, v. 105, p. 31-34, 1995.

BOWER, S.; KINGDOM, J.; CAMPBELL, S. Objective and subjective assessment of abnormal uterine artery doppler flow velocity waveforms. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 12, p. 260-264, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Mortalidade maternal**. Mar. 29, 2007 (on-line) Disponível em: <http://www.saúde.gov.br>. Acesso em: maio de 2011.

BRONSENS, I.; ROBERTSON, W.B.; DIXON, H.G. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. **J Path Bact**, v. 93, p. 569, 1967.

BROWN, M.A. *et al.* The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the international society for the study of hypertension in pregnancy (ISSHP). **Hypertension in pregnancy**, v. 20, p. IX-XIV, 2001.

BUJOLD, E. *et al.* Evidence supporting that the excess of sVEGFR-1 concentration in maternal plasma in preeclampsia has a uterine origin. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 18, n. 1, p. 9-16, 2005.

CAMPBELL, S.; BEWLEY, S.; COHEN-OVERBROOK, T. Investigation of the uteroplacental circulation by Doppler ultrasound. **Semin Perinatol**, v. 11, p. 362-8, 1987.

CAMPBELL, S. *et al.* Doppler ultrasound of the maternal uterine arteries: disappearance of abnormal waveforms and relation to birthweight and pregnancy outcome. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 79, p. 631-4, 2000.

CAMPBELL, S. *et al.* Qualitative assessment of uteroplacental blood flow: early screening test for high-risk pregnancies. **Obstet Gynecol**, v. 68, p. 649-653, 1986.

CARMIELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p.653-660, Jun, 2003.

CHAIWORAPONGSA, T. *et al.* Evidence supporting a role for the vascular endothelial growth factor in the pathophysiology of preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 190, p. 1541-50, Mar, 2003.

CHAIWORAPONGSA, T. *et al.* Plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 concentration is elevated prior to the clinical diagnosis of pre-eclampsia. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 17, p. 3-18, 2005.

CHAIWORAPONGSA, T. *et al.* The maternal plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 concentration is elevated in SGA and the magnitude of the increase relates to Doppler abnormalities in the maternal and fetal circulation. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v.21,p.25-40,2008.

CHAN, F.Y. *et al.* Pregnancy screening by uterine artery Doppler velocimetry: which criterion performs best? **Obstet Gynecol**, v. 85, p. 596-602, 1995.

CHIEN, P.F.W. *et al.* How useful is uterine artery Doppler flow velocimetry in the prediction of pre-eclampsia, intrauterine growth retardation and perinatal death? An overview. **Br J Obstet Gynecol**, v. 107, p. 196-208, 2000.

COLEMAN, M.A.; McCOWAN, L.M.; NORTH, R.A. Mid-trimester uterine artery Doppler screening as a predictor of adverse pregnancy outcome in high-risk women. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 15, p. 7-12, 2000.

CONDE-AGUDELO, A.; ROMERO, R.; LINDHEIMER, M.D. Test to predict preeclampsia. Cap. 11. In: LINDHEIMER, M.D.; CUNNINGHAM, F.; ROBERTS, J. **Chesley's hypertensive disorders in pregnancy**, 3rd ed., p. 189-211. AP, 2009.

CONDE-AGUDELO, A.; VILLAR, J.; LINDHEIMER, M. World Health Organization systematic review of screening tests for preeclampsia. **Obstet Gynecol**, v. 104, p. 1367-91, 2004.

CNOSSEN, J.S. *et al.* Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. **CMAJ**, v. 178, p. 701-11, 2008.

COTTER, A.M. *et al.* Increased fetal DNA in the maternal circulation in early pregnancy is associated with an increased risk of preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 191, p. 515-520, 2004.

CRISPI, F. *et al.* Predictive value of angiogenic factors and uterine artery doppler for early-versus late-onset pré-eclampsia and intrauterine growth restriction. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 31, p. 303-309, 2008.

CROY, B.A. *et al.* Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. **Reproduction**, v. 126, p. 49-160, 2003.

DAVISON, J.M. *et al.* New aspects in the pathophysiology of preeclampsia. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, p. 2440-2448, 2004.

DEKKER, G.A.; SIBAI, B.M. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: Current concepts. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 179, n. 5, p. 1359-1375, Nov, 1998.

DIAB, A.E. *et al.* Angiogenic factors for the prediction of pre-eclampsia in women with abnormal midtrimester uterine artery Doppler velocimetry. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 102, p. 146-151, 2008.

DUCKITT, K.; HARRINGTON, D. Risk factor for pre-eclampsia at antenatal booking: Systematic review of controlled studies. **BJM**, p.1-7, Mar, 2005.

DUNK, C. *et al.* Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2 active trofoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. **Am J Phatol**, v. 156, n. 6, p. 2185-2199, 2000.

EREMINA, V. *et al.* Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. **J Clin Invest**, v. 111, p. 707-716, 2003.

EREZ, O. *et al.* The change in concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors in maternal plasma between the first and second trimesters in risk assessment for the subsequent development of preeclampsia and small-for-gestational age. **J Matern Fetal Neonatal Méd**, v. 21, p. 279–287, 2008.

ESPINOZA, J. *et al.* Identification of patients at risk for early onset and/or severe preeclampsia with the use of uterine artery Doppler velocimetry and placental growth factor. **Am J Obstet Gynecol**, v. 196, p. 326.e1-13, 2007.

EVANS, P.W. *et al.* A longitudinal study of maternal serum vascular endothelial growth factor in early pregnancy. **Hum Reprod**, Oxford, v.13, p. 1057-62, 1998.

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LECOUNTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p. 660-676, Jun, 2003.

FIEDLER, F. *et al.* VEGF-A and PLGF-1 Stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. **Bioch Biophys Res Com**, v. 334, p. 561-568, Jul, 2005.

FISHER, S.J.; McMASTER, M.; ROBERTS, J.M. **The placenta in normal pregnancy and preeclampsia**. Cap. 5, p. 73-85. In: LINDHEIMER, M.D.; CUNNINGHAM, F.; ROBERTS, J. Chesley's hypertensive disorders in pregnancy.. 3 rd ed., AP, 2009.

FLAMME, T.F.; FROLICH, T.; RISAU, W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. **J Cell Physiol**, Philadelphia, v. 173, p. 206-210, 1997.

FLEISHER, A. *et al.* Uterine artery doppler velocimetry in pregnant women with hypertension. **Am J Obstet Gynecol**, v. 154, p. 806-814, 1996.

FRUSCA, T. *et al.* Role of uterine artery doppler investigation in pregnant women with chronic hypertension. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 79, p. 47-50, 1998.

GEVA, E. *et al.* Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (Branching and Nonbranching) transformation Is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. **J Clin Endocrinol Metab**, Philadelphia, v. 87, n. 9, p. 4213-4224, Sep, 2002.

GHI, T. *et al.* The prognostic role of uterine artery Doppler studies in patients with late-onset preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 201, p. 36.e1-5, 2009.

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

GILBERT, J.S. *et al.* Recombinant vascular endothelial growth factor 121 infusion lowers blood pressure and improves renal function in rats with placental ischemia-induced hypertension. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 380-5, 2010.

GOMEZ, O. *et al.* Sequential changes in uterine artery blood flow pattern between the first and second trimesters of gestation in relation to pregnancy outcome. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 28, p. 802-808, 2006.

GUZIN, K. *et al.* The relation of increased uterine artery blood flow resistance and impaired trophoblast invasion in pre-eclamptic pregnancies. **Arch Gynecol Obstet**, v. 272, p. 283-8, 2005.

GUZMANN, E.R.; KONTOPOULOS, E.; ZALUD, I. Doppler velocimetry of uteroplacental circulation. In: MAULIK, D.; ZALUD, I. **Doppler ultrasound in obstetrics and gynecology**. 2. revised, cap. 16, p. 227-252. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005.

HADKER, N. Financial impact of a novel pre-eclampsia diagnostic test versus standard practice: a decision-analytic modeling analysis from a UK healthcare payer perspective. **J Med Econ**, v. 13, n. 4, p. 728-37, 2010.

HANNA, J. *et al.* Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal maternal interface. **Nat Med**, v. 12, p. 1065-1074, 2006.

HARRINGTON, K. *et al.* The value of uterine artery doppler in the prediction of uteroplacental complications in multiparous women. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 23, p. 50-55, 2004.

HELSKE, S. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1, 2, and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies. **Mol Hum Reprod**, v. 7, n. 2, p. 205-10, Feb, 2001.

HUBEL, C.A. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 222, p. 222-235, 1999.

JAUNIAUX, E.; WATSON, A.; BURTON, G. Evaluation of respiratory gases and acid-base gradients in human fetal fluids and uteroplacental tissue between 7 and 16 weeks gestational. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v.1 84, p. 998-1003, Apr, 2001.

JAUNIAUX, E. *et al.* Doppler ultrasonographic features of the developing placental circulation: correlation with anatomic finding. **Am J Obstet Gynecol**, p. 166:585-7, 1992.

JEFFREY, S. *et al.* Recombinant vascular endothelial growth factor 121 infusion lowers blood pressure and improves renal function in rats with placental Ischemia-induced hypertension. **Hypertension**, v. 55, p. 380-385, 2010.

KARUMANCHI, S.A.; BDOLAH, Y. Hypoxia and sflt-1 in preeclampsia: the "chicken-and-egg" question. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 4835-7, Nov, 2004.

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

KARUMANCHI, S.A. *et al.* Preeclampsia: A renal perspective. **Kidney international**, v. 67, p. 2101-2113, 2005.

KARUMANCHI, S.A.; LINDHEIMER, M.D. Preeclampsia pathogenesis: "triple a rating": Autoantibodies and antiangiogenic factors. **Hypertension**, v. 51, p. 991-992, 2008.

KAUFMANN, P.; BLACK, S.; HUPPERTZ, B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardations and pré-eclâmpsia. **Biol Reprod**, v. 69, p. 1-7, Feb, 2003.

KHAN, K.S.; WOJDYLA, D.; SAY, L. Who analysis of causes of maternal death **Lancet**, v. 367, p. 1066, 2006.

KHONG, T.Y. *et al.* Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 93, p. 1049-1059, 1986.

KINGDOM, J.C. *et al.* Development of placental villous tree and its consequences for fetal growth. **Eur J Obst Gynecol**, Limerick, v. 92, p. 35-43, Sep, 2000.

KOPCOW, H.D.; KARUMANCHI, S.A. Angiogenic factors and natural killer (NK) cells in the pathogenesis of preeclampsia. **J Reprod Immunol**, v. 76, p. 23-9, 2007.

KUSANOVIC, J.P. *et al.* A prospective cohort study of the value of maternal plasma concentrations of angiogenic and antiangiogenic factors in early pregnancy and midtrimester in the identification of patients destined to develop preeclampsia. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 22, n. 11, p. 1021-38, 2009.

LAM, C.; LIM, K.H.; KARUMANCHI, S.A. Circulationm angiogrnic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. **Hypertension**, v. 46, p. 1077-1085, 2005.

LASH, G.E. *et al.* The effects of angiogenic growth factor on extravillous trofoblast invasion and motility. **Placenta**, London, v. 21, p. 593-595, Nov, 2000.

LEES, C. Uterine artery doppler: time to establish the ground rules. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 16, p. 607-609, 2000.

LEVINE, R.J. *et al.* Circulating angiogenic factors and risk of preeclampsia. **N Engl J Med**, London, v. 350, n. 7, p. 672-83, Feb, 2004.

LEVINE, R.J. *et al.* Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. **N Engl J Med**, v. 355, p. 992-1005, 2006b.

LEVINE, R.J. *et al.* Urinary placental growth factor and risk of preeclampsia. **JAMA**, v. 293, n. 1, p. 77-85, 2005.

LI, F.X. *et al.* Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. **J Clin Endoc Metabol**, v. 86, n. 4, p. 1823-1834, Dec, 2000.

LI, F.H. *et al.* Hypoxia-induced increase soluble production correlates with enhanced oxidative stress in trophoblast cells from the human placenta **Placenta**, v. 26, p. 210-217, May, 2005.

LI, Z. *et al.* Recombinant vascular endothelial growth factor 121 attenuates hypertension and improves kidney damage in a rat model of preeclampsia. **Hypertension**, v. 50, p. 686-692, 2007.

LIM, J.H. *et al.* Effective prediction of preeclampsia by a combined ratio of angiogenesis-related factors. **Obstet Gynecol**, v. 111, p. 1403-1409, 2008.

LIN, S. *et al.* Uterine artery doppler velocimetry in relation to trophoblast migration into the myometrium of the placental bed. **Obstet Gynecol**, v. 85, p. 760-765, 1995.

LINDHEIMER M, ROBERTS J, CUNNINGHAM F. Test to predicts preeclampsia. **Chesle'y Hypertensive Disorders in pregnancy**. Third edition. Cap 11, pg: 198, 2009.

LIVINGSTON, J.C. *et al.* Reductions of vascular endothelial growth factor and placental growth factor concentrations in severe preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis MO, v. 183, n. 6, p. 1554-557, Apr, 2000.

MADAZLI, R.T. *et al.* Prediction of preeclampsia with maternal mid-trimester placental growth factor, activin A, fibronectin and uterine artery Doppler velocimetry. **Int J Gynecol Obstet**, v. 89, p. 251-257, Feb, 2005.

MAKRIS, A. *et al.* Uteroplacental ischemia results in proteinuric hypertension and elevated sFLT-1. **Kidney Int**, v. 71, p. 977-984, 2007.

MASUDA, Y. *et al.* Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. **Am J Pathol**, v. 159, p. 599-608, 2001.

MATSUBARA, K. *et al.* Lymphokine-activated killer cells induced from decidual lymphocytes reduce the angiogenic activity of trophoblasts by enhancing the

release of soluble fms-like tyrosine Kinase-1 from trophoblasts: An implication for the pathophysiology of preeclampsia. **J Reprod Immunol**, v. 68, p. 27-37, Jul, 2005.

MAYNARD, S.E. *et al.* Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **J Clin Invest**, v. 111, p. 649-58, 2003.

McKEEMAN, G.C. *et al.* Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) is increased throughout gestation in patients who have preeclampsia develop. **Am J Obstet Gynecol**, v. 191, p. 1240-1246, 2004.

MEADS, C.A. *et al.* Methods of prediction of pre-eclampsia: systematic reviews of accuracy and effective literature with economic modeling. **Health Technol Assess**, v. 12, n. 6, 2008a.

MELCHIORRE, K. *et al.* First-trimester uterine artery doppler indices in term and preterm pre-eclampsia. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 32, n. 2, p. 133-7, 2008.

MELER, E. *et al.* The prognostic role of uterine artery Doppler investigation in patients with severe early-onset-preeclampsia. **Am J Gynecol**, v. 202, p. 559 e1-4, 2010.

MOFFET-KING. Natural killer cells and pregnancy. **Nat Rev Immunol**, v. 2, p. 656-663, 2002.

MONTENEGRO, C.A.B *et al.* Valor preditivo para a toxemia do doppler das artérias uterinas. **Progresos en Diagnostico Prenatal**, v. 10, p. 16-19, 1998.

MOORE SIMAS, T.A. *et al.* Angiogenic factors for the prediction of preeclampsia in high-risk women. **Am J Obstet Gynecol**, v. 197, p. 244-248, 2007.

MULLER, P.R. *et al.* Circulating angiogenic factors and abnormal uterine artery Doppler velocimetry in second trimester. **Hypertens Pregnancy**, v. 25, n. 3, p. 183-92, 2006.

NAGAMATSU, T. *et al.* Cytotrophoblasts up-regulate (sFlt 1) expression under reduced oxygen: an implication for the placental vascular development and the pathophysiology of preeclampsia. **Endocrinology**, v. 145, p. 4838-45, 2004.

NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION WORKING GROUP ON HIGH BLOOD PRESSURE IN PREGNANCY. Report of the national high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 83, n. 1, p. 1689-1712, Jul, 2000.

NICOLAIDES, K.H. *et al.* A novel approach to first-trimester screening for early pre-eclampsia combining serum PP-13 and doppler ultrasound. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 27, p. 13-17, 2006.

NOORI, M. *et al.* Prospective study of placental angiogenic factors and maternal vascular function before and after preeclampsia and gestational hypertension. **Circulation**, v. 122, p. 478-487, Aug, 2010.

PAPAGEORGHIU, A.T. *et al.* Assessment of risk for the development of pre-eclampsia by maternal characteristics and uterine artery doppler. **BJOG**, v. 112, p. 703-9, 2005.

PAPAGEORGHIU, A.T. *et al.* Multicentre screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction by transvaginal uterine artery doppler at 23 weeks of gestation. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 18, p. 441-9, 2001.

PARK, Y.W. *et al.* Clinical significance of early diastolic notch depth: uterine artery Doppler velocimetry in the third trimester. **Am J Obstet**, v. 182, p. 1204-9, 2000.

PARK, Y.W. *et al.* The clinical implications of early diastolic notch in third trimester Doppler waveform analysis of the uterine artery. **J Ultrasound Med**, v. 15, p. 47-51, 1996.

PARK, Y.W. *et al.* Uterine artery doppler velocimetry during mid-second trimester to predicts complications of pregnancy based on unilateral or bilateral abnormalities. **Yon Medial J**, v. 46, p. 652-657, 2005.

PIJNENBORG, R. *et al.* Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early pregnancy. **Placenta**, v. 4, p. 397-413, 1983.

PILALIS, A. *et al.* Screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction by uterine artery Doppler and PAPP-A at 11-14 weeks' gestation. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 29, n. 2, p. 135-40, 2007.

PLASENCIA, W. *et al.* Uterine artery doppler at 11+0 to 13+6 weeks in the prediction of pre-eclampsia. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 30, p. 742-9, 2007.

POLLIOTTI, B.M. *et al.* Second-trimester maternal serum placental growth factor and vascular endothelial growth factor for predicting severe, early-onset preeclampsia. **Obstet Gynecol**, v. 101, p. 1266-74, 2003.

POON, L.C. *et al.* Hypertensive disorders in pregnancy: screening by uterine artery Doppler imaging and blood pressure at 11-13 weeks. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 34, n. 5, p. 497-502, 2009.

POWERS, R.W. *et al.* Maternal serum soluble fms-like tyrosine kinase 1 concentrations are not increased in early pregnancy and decrease more slowly postpartum in women who develop preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, Saint Louis, v. 193, p. 185-91, Nov, 2004.

RANA, S. *et al.* Sequential changes in antiangiogenic factors in early pregnancy and risk of developing preeclampsia. **Hypertension**, v. 50, p. 137-42, 2007.

RAY, J.G. *et al.* Cardiovascular health after maternal placental syndromes (CHAMPS): population-based retrospective cohort study. **Lancet**, v. 366:1797-803, 2005.

REDMAN, C.W.; SARGENT, I.L. Preeclampsia, the placenta and maternal systemic inflammatory response: a review. **Trophoblast Research**, v. 17, p. S21–S27, 2003.

ROBERTS, J.M. *et al.* Preeclampsia: An endothelial cell disorder. **Am J Obst Gynecol**, St. Louis MO, v. 161, p.1200-4, 1989.

ROBERTS JM. Pregnancy-related Hypertension. In: Creasy, R.K.; Resnik,R. *Maternal-Fetal Medicine*. 4 ed. Cap. 48:p.833-872,1999.

ROBERTS, J.M.; LAIN, K.Y. Recent insights into the pathogenesis of preeclâmpsia. **Placenta**, v. 23, p. 359-72, 2002.

ROBINSON, C.J.; JOHNSON, D.D. Soluble endoglin as a second trimester marker for preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 197, p. 174.e1–5, 2007.

ROMERO, R. *et al.* A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble VEGF receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small-for-gestational-age neonate. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 21, n. 1, p. 9-23, Jan, 2008.

SALAHUDDIN, S. *et al.* Diagnostic utility of soluble fms-like tyrosine kinase 1 and soluble endoglin in hypertensive diseases of pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 197, p. 28.e1-28.e6, 2007.

SARGENT, I.L.; GERMAIN, S.F.; SACKS, G.P. Trophoblast deportation and the maternal inflammatory response in preeclampsia. **J Reprod Immunol**. V. 59, N. 2, p. 153-60, Aug. 2003

SAVVIDOU, M.D. *et al.* Maternal endothelial function and serum concentrations of placental growth factor and soluble endoglin in women with abnormal placentation. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 32, p. 871-876, 2008.

SCHULMAN, H. *et al.* Development of uterine artery compliance in pregnancy as detected by Doppler ultrasound. **Am J Obstet Gynecol**, v. 155, p. 1031-6, 1986.

SCHWARZE, A. *et al.* Doppler ultrasound of the uterine artery in the prediction of severe complications during low-risk pregnancies. **Arch Gynecol Obstet**, v. 271, p. 46-52, 2005.

SHAN, D.M. Role of renin-angiotensin system in the pathology of preeclampsia. **Am J physiol Renal Physiol**, v. 288, p. 614-625, 2005.

SHERER, D.M.; ABULAFIA, O. Angiogenesis during Implantation, and Placental and Early Embryonic Development. **Placenta**, London, v. 22, n. 1, p. 1-13, Jan, 2001.

SIBAI, B.M. Biomarker for hypertension–preeclampsia: are we close yet? **Am J Obstet Gynecol**, v. 197, p. 1-2, 2007.

SIBAI, B.M.; DEKKER, G.A.; KUPLERMINE, M. Pre-eclampsia. **Lancet**, London, v. 365, n. 26, p. 785-99, Feb, 2005.

SIBAI, B.M. *et al.* Serum inhibin A and angiogenic factors levels in pregnancies with previous preeclampsia and/or chronic hypertension: are they useful markers for prediction of subsequent preeclampsia? **Am J Obstet Gynecol**, v. 199, p. 268.e1-268.e9, 2008.

SILASI, M. *et al.* Abnormal placentation, angiogenic factors, and the pathogenesis of preeclampsia. **Obstet Gynecol Clin N Am**, v. 37, p. 239-253, 2010.

SMITH, G.N. *et al.* A history of preeclampsia identifies women who have underlying cardiovascular risk factors. **Am J Obstet Gynecol**, v. 200, p. e51-e58, 2009.

SMITH, G.C. *et al.* Circulating angiogenic factors in early pregnancy and the risk of preeclampsia, intrauterine growth restriction, spontaneous preterm birth, and stillbirth. **Obstet Gynecol**, v. 109, p. 1316-24, 2007a.

SOREGAROLI, M. *et al.* Late normalisation of uterine artery velocimetry in high risk pregnancy. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 95, p. 42-45, 2001.

SPENCER, K. *et al.* First trimester maternal serum PP-13, PAPP-A and second-trimester uterine artery Doppler pulsatility index as markers of pre-eclampsia. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 29, p. 128-134, 2007.

SVEDAS, E. *et al.* Vascular endothelial growth factor induced functional and morphologic signs of endothelial dysfunction in isolated arteries from normal pregnant women. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis MO, v. 188, n. 1, p. 168-176, Jan, 2003.

TAYLOR, N.R. *et al.* Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: Evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 188, n. 1, 177-82, July, 2003.

TEIXEIRA, P.G. *et al.* Placental growth factor (PlGF) is a surrogate marker in preeclamptic hypertension. **Hypertension in Pregnancy**, v. 27, p. 65-73, 2006.

THADHANI, R. *et al.* First trimester placental growth factor and soluble frms-like tyrosine kinase 1 and risk for preeclampsia. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, p. 770-5, 2004.

THALER, I. *et al.* Systolic or diastolic notch in uterine artery blood flow velocity waveforms in hypertensive pregnant patients: relationship to outcome. **Obstet Gynecol**, v. 80, p. 277-82, 1992.

TSATSARIS, V. *et al.* Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclampsia patients: pathophysiological consequences. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 11, p. 5555-63, Nov, 2003.

TRANQUILLI, A.L. *et al.* Amniotic vascular endothelial growth factor (VEGF) and nitric oxide (NO) in women with subsequent preeclampsia. **Eur J Obstet Gynecol**, Limerick, v. 113: p. 17-20, May, 2004.

UNAL, E.R. *et al.* Second-trimester angiogenic factors as biomarkers for future onset preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 197, p. 211.e1-4, 2007.

VATTEN, L.J. *et al.* Changes in circulating level of angiogenic factors from the first to second trimester as predictors of preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 196, p. 239.e1-6, 2007.

VENKATESHA, S. *et al.* Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. **Nat Med**, v. 12, p. 642-649, 2006.

VIKSE, B.E. *et al.* Preeclampsia and the risk of end stage renal disease. **N Engl J Med**, v. 359, p. 800-809, 2008.

Von DADELSZEN, P.; MAGEE, L.A.; ROBERTS, J.M. Subclassification of preeclampsia. **Hypertens Pregnancy**, v. 22, p. 143-148, 2003.

WANG, A.; RANA, S.; KARUMANCHI, A.S. Preeclampsia: The role of angiogenic factors in its pathogenesis. **Physiology**, v. 24, p. 147-158, 2008.

WANG, Y.; WALSH, S.W. Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. **Placenta**, v. 22, p. 206-212, 2001.

WANG, Y.; WALSH, S.W. Placental mitochondria as a source of oxidative stress in pre-eclampsia. **Placenta**, v. 19, p. 581-586, 1998.

WATHEN, K.A. *et al.* Maternal serum-soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in early pregnancy ending in preeclampsia or intrauterine growth retardation. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, p. 180-184, 2006.

WELCH, P.C. *et al.* Correlations of placental perfusion and PLGF protein expression in early human pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 194, p. 1625-31, Jan, 2006.

WIDMER, M. *et al.* Mapping the theories of preeclampsia and the role of angiogenic factors: A systemic review. **Obstet Gynecol**, v. 109, p. 168-80, 2007.

WOLF, M. *et al.* Circulating level of antiangiogenic marker sFLT-1 are increased in first versus second pregnancies. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 193, p. 16-22, Mar, 2005.

WOODS, A.K. *et al.* Adenoviral delivery of VEGF121 early in pregnancy prevents spontaneous development of preeclampsia in BPH/5 mice. **Hypertension**, NY v. 57, n. 1, p. 94-102, Jan. 2011.

XIA, Y. *et al.* Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensina receptors on human trophoblast cells. **J Soc Gynecol Investig**, v. 10, p. 82-93, 2003.

XIA, Y.; RAMIN, S.M. Potencial roles of angiotensin receptor-activating autoantibody in pathofisiology of preeclampsia. **Hypertension**, v. 50, p. 269-275, 2007.

YU, C.K. *et al.* An integrated model for the prediction of preeclampsia using maternal factors and uterine artery Doppler velocimetry in unselected low-risk women. **Am J Obstet Gynecol**, v. 193, p. 429-36, 2005.

ZEEMAN, G.G. *et al.* Maternal and fetal artery Doppler finding in women with chronic hypertension who subsequently develop superimposed pre-eclampsia. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 14, p. 318-23, 2003.

ZHOU, C.C. *et al.* Angiotensin II induces soluble fms-like tyrosine kinase-1 release via calcineurin signaling pathway in pregnancy. **Circ Res**, v. 100, n. 1, p. 88-95, 2007.

ZHOU, C.C. *et al.* Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. **Nat Med**, v. 14, p. 855-862, 2008.

ZHOU, Y.; DAMSKY, C.H., FISHER, S.J. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? **J Clin Invest**, v. 99, p. 2152-2164, 1997.

ZHOU, Y. *et al.* Human cytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang2, PlGF-C. **Dev Biol**, v. 263, n. 1, p. 114-125, 2003.

ZHOU, Y. *et al.* Vascular endothelial growth factor ligands and receptor that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. **Am J Pathol**, v. 160, n. 4, p. 1405-1423, Jan, 2002.

ZIMMERMANN, P. *et al.* Doppler assessment of arterine and uteroplacental circulation in the second trimester in pregnancies at high risk for pré-eclampsia

and/or intrauterine growth retardation: comparison and correlation between different Doppler parameters. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 9, p. 330-338, 1997.

ZYGMUNT, M.; HERR, F. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 110, suppl 1, p. S10-s18, 2003.

ANEXO E APÊNDICES

ANEXO A – Parecer ético

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP


Parecer nº. ETIC 078/05

Interessado: Prof. Dr. Antônio Carlos Vieira Cabral
Faculdade de Medicina

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 29 de junho 2005, depois de atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado « **Ocorrência de pré-eclâmpsia conforme marcadores de angiogênese e sua correlação com o exame dopplerfluxometria** » bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

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


Prof. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640
cpg@medicina.ufmg.br



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Antônio Carlos Vieira Cabral, Cezar Alencar de Lima Rezende, Henrique Vitor Leite, Sinval Ferreira de Oliveira e André Luiz Barbosa Roquette, aprovou a defesa da tese intitulada **“AVALIAÇÃO DO VALOR PREDITIVO DO PIGF E DO sFit-1 E DO DOPPLER DAS ARTÉRIAS UTERINAS NO RASTREAMENTO DA PRÉ-ECLAMPSIA”** apresentada pela doutoranda **PATRÍCIA GONÇALVES TEIXEIRA**, para obtenção do título de doutor em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração em Perinatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 29 de junho de 2011.

Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral
Orientador

Prof. Cezar Alencar de Lima Rezende

Prof. Henrique Vitor Leite

Prof. Sinval Ferreira de Oliveira

Prof. André Luiz Barbosa Roquette FUMEC



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 - sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30130-100
Fone (031) 3409.9641 FAX (31) 3409.9640
epg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE TÊSE DE DOUTORADO de **PATRICIA GONÇALVES TEIXEIRA**, nº de registro 2007675200. No dia **vinte e nove do mês de junho de 2011**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de Tese indicada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“AVALIAÇÃO DO VALOR PREDITIVO DO PIGF E DO sFit-1 E DO DOPPLER DAS ARTÉRIAS UTERINAS NO RASTREAMENTO DA PRÉ-ECLAMPSIA”**, requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração em Perinatologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APTO</u>
Prof. Cezar Alencar de Lima Rezende	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APTO</u>
Prof. Henrique Vitor Leite	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APTO</u>
Prof. Sinval Ferreira de Oliveira	Instituição: FCMMG	Indicação: <u>APTO</u>
Prof. André Luiz Barbosa Roquette	Instituição: FUMEC	Indicação: <u>APTO</u>

Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de junho de 2011.

Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral _____

Prof. Cezar Alencar de Lima Rezende _____

Prof. Henrique Vitor Leite _____

Prof. Sinval Ferreira de Oliveira _____

Prof. André Luiz Barbosa Roquette _____

Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral/Coordenador _____

Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Saúde da Mulher
Faculdade de Medicina - UFMG

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

CONFERE COM O ORIGINAL
Centro de Pós-Graduação

APÊNDICE A - Representações gráficas das concentrações dos fatores de angiogênese no segundo trimestre da gravidez em relação aos eventos encontrados no final do estudo

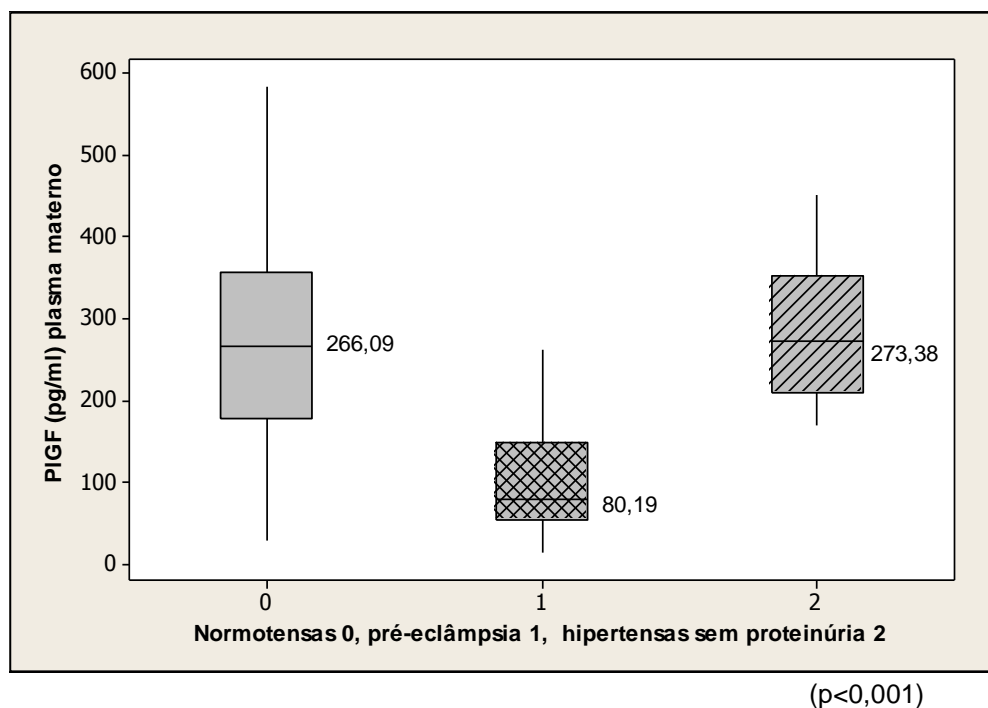


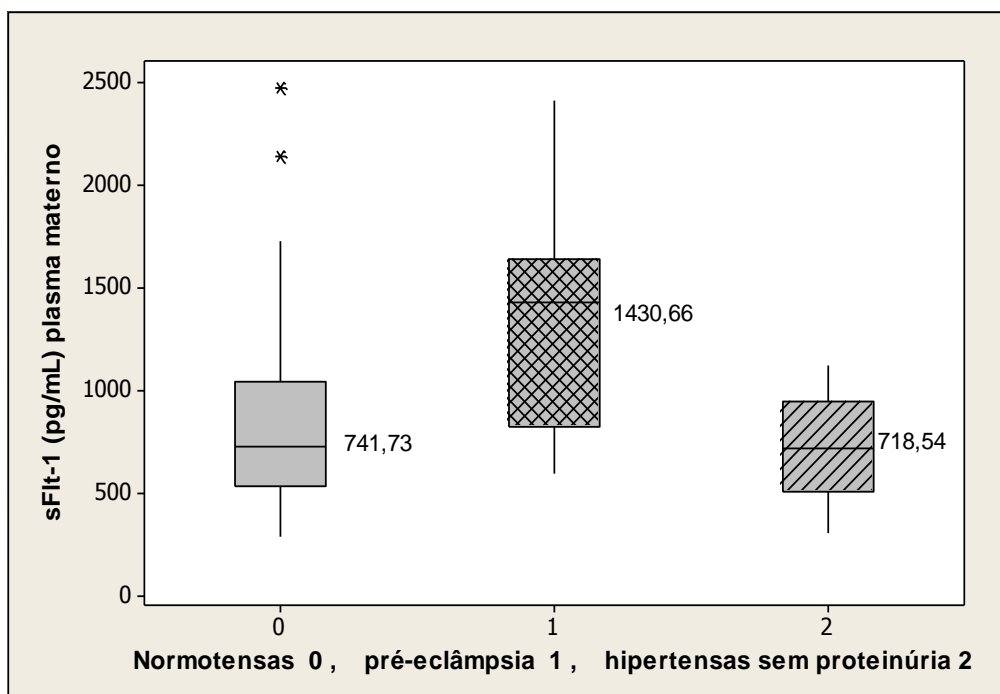
GRÁFICO 13 - Representação por caixas da concentração do PIGF (pg/mL) no segundo trimestre da gravidez, nos grupos de gestantes que se formaram no final do estudo.

A concentração sérica do PIGF foi significativamente diferente no segundo trimestre da gravidez, nos grupos de gestantes que se formaram no final do estudo ($p < 0,001$). As gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia apresentaram menores concentrações plasmáticas de PIGF em relação ao grupo das gestantes normotensas e hipertensas sem proteinúria. A concentração no plasma do PIGF nas gestantes com pré-eclâmpsia foi aproximadamente três vezes menor em relação às gestantes normotensas.

As medianas da concentração do PIGF (pg/mL) nas normotensas foi de 266,09 vs 80,19 na pré-eclâmpsia, $p < 0,001$.

A análise comparativa das medianas do PIGF (pg/mL) nas gestantes normotensas em relação às hipertensas sem proteinúria foi de 266,70 vs 273,38, respectivamente, $p=0,628$.

A concentração sérica do PIGF (pg/mL) diferenciou no segundo trimestre o grupo de gestantes que mais tarde desenvolveram pré-eclâmpsia em relação às gestantes normotensas, mas não foi capaz de diferenciar o grupo de gestantes com elevação da pressão arterial sem proteinúria.



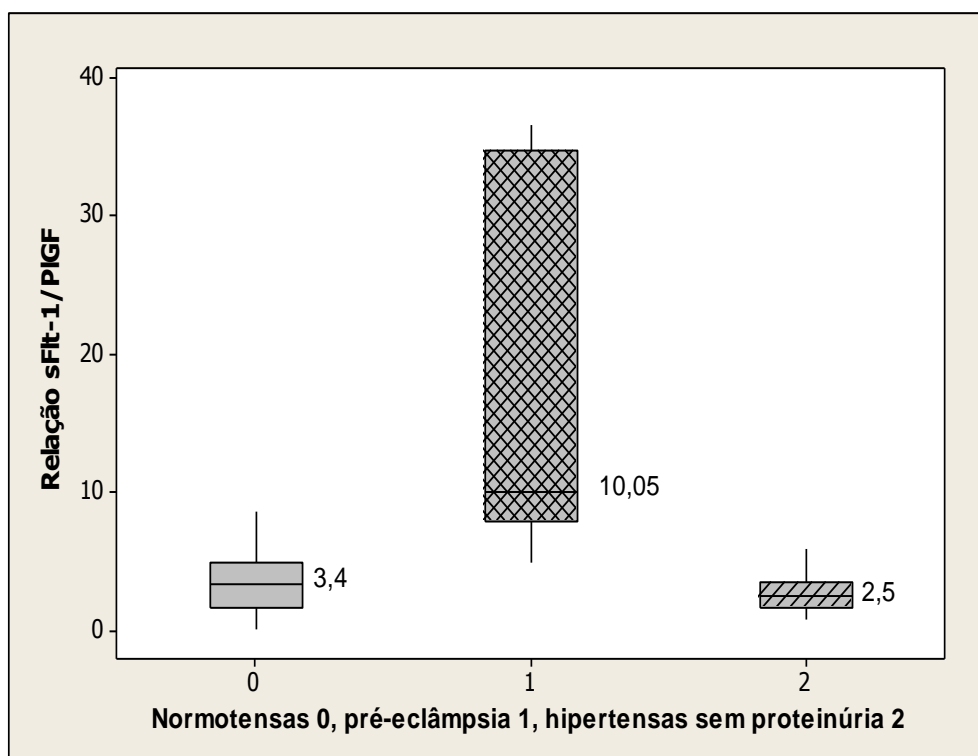
($p=0,004$)

GRÁFICO 14 - Representação por caixas das concentrações do sFlt-1 (pg/mL) no segundo trimestre em relação ao evento final da gravidez.

O GRÁF. 14 representa o intervalo interquartil, a mediana e os valores máximo e mínimo do sFlt-1 em pg/mL no segundo trimestre da gravidez. O teste de significância entre as medianas ressalta que já havia diferença na concentração desse fator entre as gestantes que mais tarde permaneceram normotensas, desenvolveram PE ou com elevação da pressão arterial sem proteinúria (741,73 vs 1.430,66 vs 718,54 pg/mL, respectivamente), $p=0,004$.

Os valores das medianas da concentração de sFlt-1(pg/mL) foram significativamente mais altos nas gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia em relação às gestantes que permaneceram normotensas (725,66 vs 1.430,66 pg/mL, respectivamente), $p=0,003$.

A concentração do sFlt-1 não diferenciou, no segundo trimestre da gravidez, as gestantes que continuaram normotensas das gestantes que apresentaram pressão alta na gravidez, sem proteinúria ($p=0,268$).



($p<0,001$)

GRÁFICO 15 - Representação por caixas da relação sFlt-1/PIGF no segundo trimestre em relação aos eventos clínicos no final da gravidez.

A diferença no resultado numérico da relação entre sFlt-1/PIGF entre os três grupos formados na internação para o parto ($p<0,001$) está demonstrada no GRÁF. 15.

O resultado quantitativo da relação sFlt-1/PlGF nas gestantes que permaneceram normotensas foi estatisticamente diferente daquelas que evoluíram para a pré-eclâmpsia (3,40 vs 10,05). O teste de significância das medianas salienta que elas são diferentes $p < 0,001$.

O valor resultante da relação sFlt-1/PlGF nas gestantes que permaneceram normotensas não foi estatisticamente diferente daquelas que tiveram pressão arterial elevada, sem proteinúria (3,45 vs 2,50, $p = 0,083$).