Karen Hettfleisch

**Avaliação da relação entre os índices vasculares
placentários e a exposição individual à poluição
atmosférica no primeiro trimestre.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de: Obstetrícia e Ginecologia

Orientadora: Dr^a Lisandra Stein Bernardes Ciampi de
Andrade

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Hettfleisch, Karen

Avaliação da relação entre os índices vasculares placentários e a exposição individual à poluição atmosférica no primeiro trimestre / Karen Hettfleisch. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientadora: Lisandra Stein Bernardes Ciampi de Andrade.

Descritores: 1.Placenta 2.Ultrassonografia doppler 3.Circulação placentária 4.Poluição do ar 5.Ozônio 6.Dióxido de nitrogênio 7.Primeiro trimestre da gravidez 8.Imagem tridimensional

USP/FM/DBD-501/15

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê. ”

Arthur Schopenhauer

Dedicatória

A Deus, pela vida abençoada.

Aos meus queridos pais, Sigfrid e Meire, únicos e perfeitos, obrigada por todo amor, carinho, dedicação, por possibilitarem todos os meus sonhos e apoio incondicional em todos os momentos da vida.

Ao meu querido irmão Richard, amigo, amoroso e sempre disponível para ajudar em tudo, e fundamental no apoio em informática.

Ao meu amado marido Nelson, obrigada pelo amor, companheirismo, paciência e essencial incentivo durante toda esta caminhada. Seu apoio deu brilho e fluidez a este projeto.

Ao meu amado casazinho, meus filhos que chegaram na hora certa para me transformar, mudar meu mundo e a forma de enxergá-lo. Vocês já são a minha vida.

Agradecimientos

À minha querida orientadora Dra. Lisandra Stein Bernardes Ciampi de Andrade, pelos ensinamentos, pelo exemplo de médica competente e humana. Obrigada pela excelente orientação, por estar sempre à disposição, pela dedicação, comprometimento, pelo incentivo essencial e pela amizade e confiança.

Ao Prof. Dr. Marcelo Zugaib, pela oportunidade de desenvolver este projeto na Clínica de Obstetrícia do Instituto Central do Hospital das Clínicas.

À Profa. Dra. Rossana Pulcineli Vieira Francisco, pela idealização, organização e condução do projeto PROCRIAR. Obrigada pelas críticas, elogios e sugestões na banca de qualificação, as quais foram importantes para a construção da tese.

Ao Prof. Dr. Mario Henrique Burlacchini de Carvalho, pela disponibilidade em participar da banca de qualificação, pelos comentários, sugestões e contribuições fundamentais para o aprimoramento da dissertação.

À Dra. Carla Fagundes Silva de Paula, pela disposição e ensinamentos sobre a técnica VOCAL, assim como pelas contribuições importantes na banca de qualificação.

A todos os médicos assistentes e professores da Clínica Obstétrica da FMUSP, em especial, do setor de Medicina Fetal, exemplos de profissionalismo, com os quais obtive um excelente aprendizado e crescimento em minha formação médica, desde a graduação, passando pela residência, e agora em Medicina Fetal. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Paulo H. N. Saldiva pelas reuniões com excelentes discussões sobre poluição e o projeto, com contribuições essenciais.

À grande amiga Mariana Azevedo Carvalho, companheira fundamental do projeto, sempre pronta a apoiar. Aprendi muito com sua amizade, sua determinação e seus ensinamentos. Amiga para a vida inteira.

À grande amiga Bruna Maria Lopes Barbosa, pela amizade, carinho, incentivo, convivência dentro e fora dos ambulatórios. Amizade que se torna cada dia mais rica e valiosa.

À querida amiga Janaína D. Negrão, pela amizade e companheirismo, pela imensurável ajuda no atendimento às pacientes do projeto, e sempre de uma maneira agradável

Às queridas amigas Mariana Yumi Miyadahira, Marisa Akemi Takeno, Julianny Cavalheiro Nery Nakano, Renata Montes Dourado, Marcela Vieira Xavier, pela amizade, convivência agradável e harmoniosa, pelos ensinamentos e troca de conhecimentos valorosos.

A todos os colegas e amigos estagiários e pós-graduandos da Medicina Fetal, pelo companheirismo, bom relacionamento profissional e aprendizado.

Às colegas do projeto, Dra. Luciana Duzolina M. Pastro e Ana Lúcia Castro, que sempre estiveram prontas e dispostas a colaborar e ajudar em conhecimentos técnicos, além da convivência agradável e presteza no atendimento às pacientes.

A todos os participantes do projeto que proporcionaram seu ótimo andamento, com parceria e empenho.

À Sra. Lucinda Cristina Pereira, pela dedicação e todo apoio com carinho na parte burocrática da pós-graduação.

Aos funcionários do ambulatório, da secretária, da informática e equipe de enfermagem da Clínica Obstétrica, pela colaboração, apoio e dedicação em ajudar com o andamento do projeto.

À Agatha Rodrigues, profissional competente e compromissada, agradeço pela paciência e pela valiosa contribuição em meu aprendizado em análise estatística.

Às gestantes voluntárias, pela disponibilidade, vontade e gentileza em participar deste projeto.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	9
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1 Placentação.....	12
3.2 Influência da poluição na placentação.....	16
3.3 Avaliação da placenta: Ultrassonografia 3D.....	19
3.4 Avaliação da placenta pela ultrassonografia 3D e predição de desfechos adversos.....	23
4. CASUÍSTICA E MÉTODO.....	28
4.1 Desenho do estudo.....	30
4.2 Seleção e seguimento das pacientes.....	31
4.3 Recrutamento e dinâmica do projeto.....	32
4.4 Métodos.....	34
4.5 Análise estatística.....	43

5. RESULTADOS.....	46
5.1 Resultados gerais.....	47
5.2 Análise estatística.....	48
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÃO.....	68
8. ANEXOS.....	70
8.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.....	71
8.2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – “Impacto das exposições à poluição durante a vida intra-uterina e pós-natal sobre a saúde respiratória da criança”.....	73
9. REFERÊNCIAS.....	78

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ANOVA	análise de variância
API	Amostrador passivo individual
CCN	Comprimento Cabeça-Nádega
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CO	Monóxido de carbono
DP	Desvio-padrão
<i>et al.</i>	e colaboradores
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> (fator de crescimento de fibroblastos)
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
IF	Índice de Fluxo
IG	Idade Gestacional
IMC	Índice de massa corporal
INAIRA	Instituto Nacional de Análise Integrada de Risco Ambiental
IP	Índice de pulsatilidade
IV	Índice de Vascularização
IVF	Índice de Vascularização e Fluxo
Log	Logaritmo
LPAE	Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental
MP	Material particulado
MP ₁₀	Material particulado com tamanho menor que 10 µm
MP _{2,5}	Material particulado com tamanho menor que 2,5 µm
MP _{0,1}	Material particulado com tamanho menor que 0,1 µm
N	Número de casos
NO	Óxido nítrico
NO _x	Óxidos de azoto
NO ₂	Dióxido de Nitrogênio
O ₃	Ozônio
SO ₂	Dióxido de enxofre

p	nível de significância
PE	Pré-eclâmpsia
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i> (fator de crescimento placentário)
PRF	<i>Pulse Repetition Frequency</i> (frequência de repetição de pulso)
RCF	Restrição de Crescimento Fetal
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> (Características de Operação do Receptor)
sFlt-1	<i>Soluble fms-like tyrosine kinase-1</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UBS	Unidade básica de saúde
US	Ultrassonografia
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (fator de crescimento vascular endotelial)
VOCAL	Virtual Organ Computer-Aided Analysis (Análise Virtual de órgãos auxiliada por computador)
2D	Bidimensional
3D	tridimensional
3DPD	3D <i>Power Doppler</i>
<	Menor
%	Por cento

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Logo do projeto ProcriAR.....	30
Figura 2	Dinâmica do projeto ProcriAR.....	34
Figura 3	Filtros de celulose.....	36
Figura 4	Amostrador passivo individual pronto para ser embalado.....	36
Figura 5	Instruções para uso do amostrador passivo individual.....	36
Figura 6	Comparação visual entre os filtros de dióxido de nitrogênio antes e após a exposição. Filtros não danificados.....	37
Figura 7	Comparação visual entre os filtros de ozônio antes e após a exposição. Filtros não danificados.....	38
Figura 8	Captura da placenta pela ultrassonografia 3D associada ao power Doppler com o método VOCAL.....	42
Figura 9	Cálculo automático do volume placentário e dos índices de vascularização (histograma power Doppler tridimensional) pela ultrassonografia 3D associada ao power Doppler com o método VOCAL.....	42
Figura 10	Fluxograma de pacientes no primeiro trimestre.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características descritivas dos dados coletados no primeiro trimestre(n=229).....	49
Tabela 2	Coeficiente de correlação de Spearman entre o logaritmo das variáveis placentárias do primeiro trimestre e a idade gestacional.....	50
Tabela 3	Coeficiente de correlação de Spearman entre o logaritmo das variáveis placentárias e o IMC no primeiro trimestre.....	51
Tabela 4	Coeficiente de correlação de Spearman entre os poluentes dosados no primeiro trimestre.....	51
Tabela 5	Coeficiente de correlação de Spearman entre o logaritmo das variáveis placentárias e a exposição aos poluentes no primeiro trimestre.....	52
Tabela 6	Apresentação das médias e desvio-padrão do volume e índices placentários em gestantes tabagistas e não-tabagistas no primeiro trimestre.....	53
Tabela 7	Apresentação das médias e desvio-padrão do volume e índices placentários em placentas não-posterior e posterior no primeiro trimestre.....	53
Tabela 8	Apresentação das médias e desvio-padrão do volume e índices placentários em gestantes nulíparas e múltíparas no primeiro trimestre.....	54
Tabela 9	Estimativas dos coeficientes e valores de p dos modelos de regressão linear múltipla no primeiro trimestre.....	55
Tabela 10	Estimativas dos coeficientes e valores de p dos modelos finais de regressão linear múltipla no primeiro trimestre.....	57

Hettfleisch, K. *Avaliação da relação entre os índices vasculares placentários e a exposição individual à poluição atmosférica no primeiro trimestre* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

OBJETIVO: Avaliar a influência dos efeitos da poluição atmosférica sobre o volume e a vascularização placentários no primeiro trimestre. **MÉTODOS:** O presente estudo é uma coorte prospectiva realizada de outubro de 2011 a março de 2014, em São Paulo, Brasil. Os critérios de inclusão foram: feto único, idade gestacional entre 11 semanas e 13 semanas e 6 dias, ausência de doença materna, ausência de malformações e utilização correta do amostrador passivo individual de poluentes. Os critérios de exclusão foram: gestação gemelar, malformações e abortamento diagnosticados à ultrassonografia, mudança de endereço para fora da área de recrutamento, desistência da paciente, doença materna diagnosticada durante o acompanhamento. A exposição à poluição foi avaliada por 7 a 18 dias, antes da avaliação ultrassonográfica, utilizando-se amostrador passivo individual dos poluentes NO₂ e de O₃. Após uso do filtro, as gestantes eram avaliadas na Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (FMUSP). Nesse local, elas foram submetidas à ultrassonografia morfológica entre 11 semanas e 13 semanas e 6 dias e à avaliação placentária pela técnica tridimensional associada ao *power* Doppler. Por meio desse exame foram avaliados quantitativamente o volume da placenta e seus índices vasculares placentários (com o software VOCAL), os quais compreendem: índice de vascularização (IV), índice de fluxo (IF) e índice de vascularização e fluxo (IVF). A influência dos níveis de poluentes na vascularização e volume placentários log-transformada foi analisada utilizando modelos de regressão linear múltipla que controlavam a idade gestacional, índice de massa corpórea, tabagismo, localização da placenta e paridade. **RESULTADOS:** Foram avaliadas 229 gestantes no primeiro. O aumento dos níveis de NO₂ no primeiro trimestre teve um efeito negativo significativo sobre o IV ($p = 0,012$ e $\beta = -0,160$) e IVF ($p = 0,015$ e $\beta = -0,159$). Não houve influência de NO₂ e O₃ no volume placentário ou IF. **CONCLUSÃO:** A exposição materna ao NO₂ foi significativamente associada com diminuição do índice de vascularização e do índice de vascularização e fluxo no primeiro trimestre da gravidez, o que sugere que esse poluente e outros poluentes primários e secundários, os quais estão associados ao NO₂, influenciam na placentação, reduzindo sua vascularização.

Descritores: Placenta; Ultrassonografia Doppler; Vascularização placentária; Poluição do ar; Ozônio; Dióxido de nitrogênio; Primeiro trimestre da gravidez; Imagem tridimensional.

Abstract

Hettfleisch, K. *Evaluation of the placental vascular indices and individual exposure to air pollution in the first trimester* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

OBJECTIVE: To evaluate the influence of air pollution on the volume and placental vascularization in the first trimester. **METHODS:** This study is a prospective cohort conducted from October 2011 to March 2014 in São Paulo, Brazil. The inclusion criteria were single fetus, gestational age between 11 weeks and 13 weeks and 6 days, the absence of maternal disease, fetal defects and correct use of passive personal monitors pollutants. The exclusion criteria were twin pregnancy, abortion and malformations diagnosed on ultrasound, change of address out of the area of recruitment, patient abandonment, and maternal disease diagnosed during follow-up. The pollution exposure was evaluated by 7 to 18 days, before the ultrasound evaluation, using passive personal monitors pollutants of NO₂ and O₃. After using the filter, the pregnant women were evaluated at Obstetrics Department from Hospital das Clínicas of Faculdade de Medicina de São Paulo (FMUSP). In this place, they were subjected to morphological ultrasound between 11 weeks and 13 weeks and 6 days and placental evaluation by the three dimensional ultrasound power Doppler. Through the ultrasound examination were quantitatively evaluated the volume of the placenta and their placental vascular indices (with VOCAL software), which comprise the vascularization index (VI), flow index (FI) and vascularization flow index (VFI). The influence of pollutant levels on log-transformed placental vascularization and volume was analyzed using multiple linear regression models that controlled for gestational age, body mass index, smoking status, placental location and parity. **RESULTS:** In the first trimester 229 pregnant women were evaluation. NO₂ levels increased in the first trimester had a significant negative effect on the VI ($p=0.012$ and $\beta=-0.160$) and the VFI ($p = 0.015$ and $\beta= -0.159$). No effect of NO₂ and O₃ on the log of placental volume or FI was observed. **CONCLUSION:** NO₂ exposure was significantly associated with a diminished Vascularization Index and Vascularization and Flow Index in the first trimester of pregnancy, which suggests that this pollutant and other primary and secondary pollutants that are associated with NO₂ influence placentation and decrease vascularization.

Descriptors: Placenta; Ultrasonography, Doppler; Placental circulation; Air pollution; Ozone; Nitrogen dioxide; Pregnancy trimester, first; Imaging, three-dimensional.

Introdução

1 – INTRODUÇÃO

Tem sido amplamente demonstrado que a poluição do ar pode afetar a saúde humana, associação já demonstrada por diversos estudos epidemiológicos e experimentais (1-5). A poluição atmosférica pode ser definida como a presença de substâncias estranhas, estejam elas nos estados gasoso, sólido ou líquido em suspensão, resultantes da atividade humana ou de ações naturais, em concentrações que as tornam nocivas e capazes de interferir direta ou indiretamente na saúde, segurança e bem-estar dos seres vivos (6, 7).

Os poluentes podem ser classificados de várias formas: primários ou secundários, dependendo da forma como são produzidos, internos ou externos, de acordo com o local de produção e de dispersão, antropogênicos ou naturais, a depender da fonte de produção, e gasosos ou particulados, conforme suas características físicas (6-8). Os poluentes primários são emitidos diretamente na atmosfera, e por meio de reações químicas e fotoquímicas originam os poluentes secundários. Atualmente, a principal fonte antropogênica da poluição atmosférica é a queima de combustíveis fósseis nos motores à combustão, seja em indústrias ou em veículos automotivos (6-8).

A região metropolitana de São Paulo, a mais rica do país, compreende 39 municípios, por volta de 21 milhões de habitantes, possui frota circulante de veículos de aproximadamente 6,7 milhões (aproximadamente 50% da frota circulante do estado) e um grande centro industrial e tecnológico (média de 688

indústrias), ou seja, uma região em que há alta concentração das principais fontes de poluição atmosférica (9).

Os principais poluentes gasosos são o monóxido de carbono (CO), o dióxido de nitrogênio (NO₂), o dióxido de enxofre (SO₂), o ozônio (O₃), compostos orgânicos voláteis (COV), os quais incluem alguns tipos de hidrocarbonetos, como o benzeno, que facilmente evaporam à temperatura ambiente. O material particulado (MP) é constituído de diversas substâncias químicas e partículas em suspensão, como nitratos, sulfatos, compostos orgânicos, poeira e os metais pesados, e apresenta classificação de acordo com o diâmetro aerodinâmico das partículas, sendo o MP grosseiro de 2,5 a 10 µm, o fino ou MP_{2,5} de 0,1 a 2,5 µm, e o ultrafino ou MP_{0,1} menor que 0,1 µm. Essas subdivisões podem ser agrupadas no chamado MP₁₀, ou seja, todo o material particulado com diâmetro menor do que 10 µm, que tem a propriedade de ser inalável e chegar até as vias aéreas inferiores, podendo ainda carregar gases adsorvidos em sua superfície (1-7, 10).

Os óxidos de azoto (NO_x) são provenientes predominantemente da frota veicular e queima industrial de derivados do petróleo, além de usinas termoelétricas. Em ambiente intradomiciliar, são produzidos por fogões a gás, aquecedores que empregam querosene e fumaça de cigarro (7). O óxido nítrico (NO) é gerado pelas reações de combustão e, na atmosfera, é oxidado em NO₂. Ele é considerado tóxico devido à sua propriedade oxidante e produtor de radicais livres (6, 8).

O ozônio é um poluente secundário formado a partir dos óxidos de azoto e hidrocarbonetos na presença de radiação solar e calor, reações químicas e

fotoquímicas que ocorrem na troposfera (camada da atmosfera mais próxima da crosta terrestre). O seu potencial tóxico e prejudicial à saúde humana também é proveniente da atividade oxidativa e citotóxica. Tanto o NO₂ como o O₃ atingem as porções mais distais das vias aéreas (6, 7, 11).

Além da concentração dos poluentes na atmosfera, seus efeitos tóxicos dependem primordialmente do nível de exposição do indivíduo a eles, ou seja, o tempo durante o qual permanece em contato, e além disso, deve-se considerar o local de residência, de trabalho, meio de transporte e o tempo no trânsito, já que os congestionamentos agravam a emissão de poluentes (7, 12, 13).

Para avaliar a concentração atmosférica dos poluentes existem as estações fixas de monitoramento do ar, as quais são as mais utilizadas, já que medem vários tipos de poluentes e são úteis em grandes estudos populacionais (14). Elas abrangem uma determinada área em torno da estação e fornecem os níveis médios de determinados poluentes dessa região. Contudo, as estações fixas não são capazes de monitorar a mobilidade individual e, portanto, não avaliam a real exposição à poluição. Esse monitoramento preciso tornou-se possível com o desenvolvimento dos amostradores passivos individuais (API), os quais ainda permitem avaliar a poluição dos ambientes internos, pois estão, durante todo o tempo, com o indivíduo. Além de apresentarem as vantagens de ser um método barato, de fácil utilização, não modificam a rotina individual, e não há necessidade do uso de bateria ou outros dispositivos (11, 15).

Já está bem estabelecido que a exposição a altas concentrações de gases poluentes está associada a danos em diversos sistemas do organismo humano (1-5), assim como prejuízos significativos no período gestacional, podendo levar a resultados obstétricos adversos, tais como pré-eclâmpsia (PE), restrição de crescimento fetal (RCF), hipóxia fetal e óbito (16-24). Tais complicações maternas e fetais têm sido pesquisadas e relatadas como consequências dos efeitos da poluição atmosférica sobre a função e crescimento da placenta (25).

Tem sido demonstrado que a exposição materna à poluição do ar pode afetar o ciclo gravídico por meio da indução de estresse oxidativo e inflamação sistêmica, disfunção endotelial, alterações no hematócrito, viscosidade sanguínea, coagulação e respostas hemodinâmicas, assim gerando inflamação placentária e prejudicando o processo da placentação, seu crescimento e função, devido também às alterações do DNA (1, 25-30). Desse modo, sugere-se que as complicações acima descritas provenientes da poluição atmosférica têm seu início na placentação anormal, caracterizada por invasão trofoblástica deficiente e falta de modificação das artérias espiraladas, comprometendo, assim, a vascularização placentária (28, 31, 32). A função da placenta depende primordialmente desses dois processos e, dessa forma, acaba sendo lesada como resultado final da interação entre os poluentes e a placentação (25-27).

Com efeito, a placenta é o órgão fundamental para o desenvolvimento do feto, já que funciona como pulmões, rins, intestinos, sendo responsável pelas trocas gasosas e de nutrientes entre a mãe e o feto, e remove os catabólitos fetais, além de apresentar capacidade endócrina, secretando

substâncias como a progesterona, estrogênio, gonadotrofina coriônica e hormônio lactogênio placentário (33-35). Ao mesmo tempo, sua função imunológica é primordial, pois permite que os anticorpos da classe IgG alcancem o feto e funciona como uma barreira a fim de impedir que diversos organismos patogênicos cheguem até a circulação fetal (35).

Na prática clínica, a placenta pode ser avaliada pela ultrassonografia (US) bidimensional (2D), que permite avaliar sua morfologia, localização, anatomia, espessura, grau de maturidade, implantação, anomalias e inserção do cordão umbilical (35). O grau de maturidade é avaliada pela quantidade de calcificações presentes, sendo classificada de acordo com a escala de Grannum (36). Já, no primeiro trimestre, ela é visível à ultrassonografia 2D, tendo uma aparência acinzentada e levemente ecogênica, estando separada visualmente do miométrio por uma camada hipoecoica.

No entanto, a US2D, apesar de permitir a avaliação tridimensional (3D) da placenta, não é o método mais eficaz para mensurar o volume placentário e sua vascularização. Em 1987, surgiu a ultrassonografia 3D, porém seu uso ainda era limitado pela técnica do aparelho, com o qual só era possível realizar observações estáticas. Logo após, em 1992, foi desenvolvida tecnologia para reconstruções de planos bidimensionais e captura volumétrica tridimensional, produzindo imagens mais nítidas (37, 38). Em 1995, Riccabona *et al.* mostraram que a avaliação do volume de estruturas irregulares é mais precisa pela US3D, sendo atualmente a técnica mais encorajada do que a US2D, pois, ela apresenta menor acurácia nas medidas adquiridas para o cálculo do volume (39).

Nos últimos anos, tem sido empregado um método combinado de ultrassonografia 3D com o *power Doppler* (3DPD) para avaliar o volume da placenta, assim como sua vascularização e a árvore placentária (31, 40-44). Essa técnica ultrassonográfica tem o potencial de representar diretamente a perfusão placentária por meio de seus índices vasculares: índice de vascularização (IV), índice de fluxo (IF) e índice de vascularização e fluxo (IVF) (40). A medida do volume placentário é diretamente proporcional à idade gestacional (45). Já os índices vasculares aparentemente não variam com a idade gestacional, como mostra o trabalho realizado por de Paula *et al.* (41). Alguns autores já demonstraram boa reprodutibilidade intra e interobservador da técnica 3DPD para avaliação da placenta (35, 46-48). Dessa forma, começou-se a investigar sua utilidade na avaliação, tanto diagnóstica como prognóstica, de patologias gravídicas que cursam com insuficiência placentária, como a PE e a RCF, já que a fisiopatologia delas está diretamente ligada a uma placentação deficiente e, conseqüentemente, lesando a sua vascularização (32). Essa técnica tem sido estudada, principalmente no primeiro e segundo trimestres, com a intenção de prever precocemente o resultado desfavorável em gestações normais e de risco elevado, tais como aquelas complicadas por PE ou RCF (49-56).

Não obstante, não há, na literatura, nenhum trabalho que avalie como o volume, a vascularização e fluxo placentários são influenciados pela poluição atmosférica. Portanto, decidiu-se estudar tal influência por meio da técnica ultrassonográfica 3DPD, no primeiro trimestre de gestação, em pacientes de baixo risco, e medindo NO₂ e O₃ com monitores individuais, já que as

atividades diárias de cada paciente podem influenciar a quantidade de poluentes às quais estão sendo expostas (57).

Objetivos

2 - OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos avaliar, em gestantes de baixo risco, o efeito da exposição individual a dióxido de nitrogênio e ozônio sobre o volume e índices de vascularização placentários avaliados por ultrassonografia tridimensional entre 11 semanas e 13 semanas e 6 dias.

Revisão de Literatura

3 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 – Placentação

A placentação tem início quando o endométrio recebe o blastocisto, entre o sexto e o décimo primeiro dia após a concepção, ocorrendo sua implantação e diferenciação em tecidos embrionários e extraembrionários (34). Esse processo depende necessariamente do trofoblasto, o primeiro tipo de célula a se diferenciar do ovo fertilizado, e sua divisão em duas camadas: o sinciotrofoblasto e o citotrofoblasto, o conjunto de células mais externo e interno, respectivamente. O sinciotrofoblasto é o responsável por invadir a decídua materna, erodindo vasos e glândulas endometriais, formando lacunas preenchidas por sangue materno e fluido endometrial, os quais irão nutrir o embrião nessa fase inicial. Tais lacunas são as precursoras dos espaços intervilosos e caracterizam o estágio lacunar do desenvolvimento do trofoblasto (58). Cerca de 12 a 15 dias pós-concepção, o citotrofoblasto penetra a camada sincicial, formando assim as vilosidades primárias. Logo após, entre 15 e 21 dias, as células do mesênquima extra-embrionário adentram o núcleo da vilosidade primária e crescem em direção à decídua, dando origem às vilosidades secundárias. Por volta do décimo oitavo dia de gestação, inicia-se o processo de vasculogênese, ou seja, a formação dos capilares das vilosidades,

constituindo-se, dessa forma, vilosidades terciárias, as quais irão compor os vilos da placenta até o final da gestação (34, 59).

As funções placentárias se iniciam por volta da quarta semana de gestação, quando as conexões anatômicas já estão estabelecidas. Ao redor da oitava semana, as vilosidades, em contato com a decídua basal, parte materna da placenta, se expandem formando o córion frondoso, o qual constituirá a parte fetal da placenta e, em sua placa corial, são formados os vasos fetais. As demais vilosidades degeneram e formam o córion liso. As vilosidades do córion frondoso vão se ramificando ao longo da gestação, formando cerca de 50 a 60 cotilédones. Essas estruturas crescem e se diferenciam a partir de 12 semanas de gestação e evoluirão até o termo, com a finalidade de suprir as necessidades do feto em desenvolvimento (58).

O volume placentário aumenta ao longo da gestação, e chega ao termo com, em média, 500 gramas e uma área de superfície vilosa entre 11 a 14m². Os cotilédones têm seu suprimento sanguíneo por meio de 80 a 100 artérias espiraladas, as quais perfuram a decídua basal e penetram os espaços intervilosos, chegando no termo com um fluxo sanguíneo materno para a placenta de 600-700ml/min (58). Esse fenômeno é decisivo para garantir o fluxo sanguíneo adequado de baixa pressão e alto fluxo placentário, e depende da apropriada invasão e diferenciação trofoblástica adentro da decídua basal e do miométrio na fase inicial da gestação, já que tal processo garante a degradação superficial das artérias espiraladas (35). No segundo trimestre, ocorre a segunda onda de invasão trofoblástica, a qual é responsável pela destruição da camada elástica dessas mesmas artérias. Todas as alterações

fisiológicas descritas estabelecem uma relação funcional adequada entre o sistema circulatório fetal e o materno.

O desenvolvimento da gestação e os resultados perinatais são influenciados por uma série de fatores, como nutrição, genética, estresse fisiológico e poluentes ambientais (25, 60). Dessa forma, o perfeito funcionamento do organismo materno é essencial para a placentação e consequentemente para a evolução da gestação e de seu produto conceptual.

A vascularização placentária ocorre por intermédio de dois processos responsáveis pela formação da rede vascular nos vilos coriônicos: a vasculogênese e a angiogênese. O desenvolvimento da vascularização placentária é primordial para o funcionamento adequado desse órgão,consequentemente, para a evolução natural da gestação. Os principais agentes que promovem tais processos são: o regime de hipóxia local, o qual estimula a proliferação e a diferenciação do trofoblasto (61), e os diversos fatores angiogênicos produzidos localmente. Dentre eles, podemos destacar o papel da família do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que inclui o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o fator de crescimento placentário 1 e 2 (PLGF-1 e 2), além de seus receptores VEGF receptor-1 (VEGFR-1, Flt-1), VEGF receptor-2 (VEGFR-2, Flk-1/KDR), VEGF receptor-3 (VEGFR-3/Flt-4). Outros fatores envolvidos são o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e angiopoeitina 1 e 2, e seus receptores Tie-1 e Tie-2 (62).

A vasculogênese inicia-se em torno do vigésimo primeiro dia pós-concepção, no vilo mesenquimal (o vilo mais primitivo), formado após a invasão do tecido mesenquimal no vilo trofoblástico primário. (63). Esse processo

corresponde à formação de vasos de novo, ou seja, a concepção dos capilares primitivos.

Por meio do VEGF liberado por trofoblasto, células de Hofbauer, pericitos e células endoteliais e do PLGF, inicia-se o estímulo para o agrupamento dos vasos primordiais, e assim a indução à transição ao processo de angiogênese, e consequente processo de maturação do vilo (62, 64). A angiogênese, por sua vez, consiste na formação e crescimento de novos vasos sanguíneos, a partir dos já existentes, portanto, pela proliferação de células endoteliais e musculares lisas (62).

Os primeiros tubos endoteliais aparecem entre 21 e 32 dias pós-concepção e o crescimento vascular continua ao longo da gestação. A vasculogênese e a parte da angiogênese ocorrem no vilo mesenquimal e no vilo intermediário imaturo. Os vilos intermediários imaturos são os principais locais de troca no primeiro e segundo trimestres, enquanto os vilos terminais ainda não se diferenciaram. De 25 semanas pós-concepção até o termo, aparecem os vilos maduros intermediários, e alguns capilares crescem em uma taxa maior do que o vilo e desenvolvem *loops* terminais e protuberâncias em direção à superfície trofoblástica, constituindo, dessa forma, os vilos terminais. Cada vilo terminal é suprido por um ou dois capilares recobertos por uma camada fina de trofoblasto, formando a membrana sincício-capilar, a unidade funcional de troca materno-fetal.

3.2 – Influência da poluição na placentação

A pré-eclâmpsia, a restrição de crescimento fetal e a hipertensão gestacional são complicações materno-fetais que têm em sua origem mecanismos de placentação inadequada (32). Ao mesmo tempo, estão associadas e correlacionadas com exposição à poluição atmosférica e, por vezes podem ser consequência desse fator ambiental (16, 19-21). Assim, estudos têm investigado se tais alterações, quando em associação com a poluição atmosférica, advêm de complicações na placentação, principalmente em sua fase inicial, caracterizada pela invasão trofoblástica deficiente e falta da remodelação das artérias espiraladas (26, 28, 32).

Alguns processos biológicos sistêmicos e específicos das estruturas materno-fetais, em resposta ao contato com poluentes, como o MP, já foram demonstrados (25). Reações de estresse oxidativo, em que, a partir da ativação de células inflamatórias, há formação de compostos reativos de oxigênio e de nitrogênio, podem ser responsáveis por lesões no DNA e no endotélio placentários (1, 25). Este também sofre ação de mediadores inflamatórios, gerando uma desorganização e disfunção endotelial, além de vasoconstrição (25). Todas essas alterações prejudicam a perfusão placentária, podendo diminuir as trocas materno-fetais e, conseqüentemente, afetar o crescimento fetal. O sistema de coagulação sanguínea também pode ser alterado, os níveis pressóricos maternos podem se elevar, devido ao estresse oxidativo, disfunção endotelial, diminuição da resposta vasodilatadora ao óxido

nítrico e aumento do tônus simpático, assim como pelo aumento da viscosidade sanguínea materna (25).

As alterações descritas acima tornam a placenta inflamada e o processo de invasão trofoblástica comprometido, resultando uma vascularização placentária prejudicada e, portanto, com função limitada (65).

A função e a vascularização placentária podem ser estudadas por meio da dosagem de seus fatores angiogênicos, entre os quais se destacam o VEGF e o PLGF, como também pelos marcadores antiangiogênicos, sendo o mais usado a forma solúvel do receptor VEGFR-1, o sFlt-1 (do inglês *soluble fms like-tyrosine*). Ao se ligar às moléculas de VEGF e do PLGF, o sFlt-1 impede que elas cheguem aos receptores de membrana, dessa forma, inibe suas atividades angiogênicas (26). O estresse oxidativo, como ocorre em resposta aos poluentes, é um importante estímulo para o aumento da produção placentária desse fator antiangiogênico (64).

Existe apenas um estudo na literatura que avalia os efeitos da poluição atmosférica sobre os fatores angiogênicos placentários. Van den Hooven *et al.* (26) realizaram uma coorte prospectiva, em Rotterdam, na qual dosaram o PLGF e o sFlt-1 séricos maternos, no primeiro e segundo trimestres, e sérico fetal, sendo este pelo cordão umbilical, no momento do parto, e correlacionaram com a exposição materna aos níveis de MP_{10} e NO_2 dosados por dispersão. As concentrações mais elevadas dos poluentes apresentaram uma associação negativa com os níveis de PLGF e positiva com o sFlt-1 no sangue fetal. É possível que esse estado antiangiogênico represente mais o ambiente placentário do que o fetal (65), corroborando a hipótese de que a

poluição leve ao referido estado. Os resultados maternos foram contraditórios, pois houve diminuição do PLGF e do sFlt-1 do segundo trimestre quando associados tanto ao MP₁₀ como ao NO₂.

Veras *et al.* (28) avaliaram a morfologia funcional placentária de ratas expostas à poluição, em São Paulo, nos períodos pré-gestacional, gestacional, e em ambos, e compararam com placentas de ratas que permaneceram em câmaras com filtros, portanto, expostas ao ar atmosférico limpo. No grupo exposto à poluição previamente à gestação, observou-se diminuição do calibre médio do espaço preenchido por sangue materno, porém aumento da área de superfície capilar fetal, da condutância total da barreira intervascular e massa-específica de difusão de oxigênio. Quando a exposição ocorreu no período gestacional, foram encontrados diminuídos nos espaços maternos o seu calibre, o volume e área sanguíneos; já, no lado fetal, houve aumento da superfície capilar e da massa-específica de condutância de oxigênio.

Dessa forma, tais achados mostram prejuízo na vascularização na parte placentária materna, sugerindo que os mecanismos dessas alterações vasculares talvez envolvam mudanças sistêmicas prévias à gestação, prejudicando o ambiente uterino. As modificações fetais indicam uma tentativa de adaptação ao ambiente inóspito poluído para manter o aporte de oxigênio e nutrientes frente aos déficits maternos. Entretanto, muitas vezes, não são suficientes, uma vez que a porcentagem de RCF foi maior no grupo exposto à poluição.

De Melo *et al.* (29) desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar o desenvolvimento placentário de ratas e sua correlação com a inflamação

sistêmica desencadeada por partículas finas de poluentes, comparando com um grupo controle. Encontraram um aumento significativo de Interleucina-4 na porção fetal da placenta de ratas expostas antes e durante a gestação. Como essa interleucina tem uma atividade anti-inflamatória, os resultados sugerem que sua concentração está aumentada devido a uma resposta ao ambiente inflamatório que a poluição atmosférica pode gerar no organismo materno, mesmo antes da gestação.

3.3 – Avaliação da placenta: Ultrassonografia 3D

A avaliação do volume de estruturas via ultrassonografia 3D iniciou-se após Riccabona *et al.*, em 1995, mostrarem *in vitro* que a acurácia desse método para objetos com formas irregulares era maior do que com a técnica 2D e, dessa forma, começou a ser estudada também para a avaliação do volume placentário *in vivo* (39, 50, 66, 67).

Em um estudo comparativo das três técnicas 3D para avaliação do volume placentário, sendo elas a multiplanar, VOCAL com rotação de 12 graus e 30 graus, Nowak *et al.* realizaram todas as técnicas em 37 gestantes entre 7 e 10 semanas. A captura foi feita com sonda endocavitária, correlacionando o volume com a idade gestacional pelo Coeficiente de Pearson. As três técnicas apresentaram forte correlação positiva, como também forte concordância entre o volume medido pelas três técnicas. No entanto, os autores concluíram que a

técnica VOCAL com rotação de 30 graus era a mais eficiente para aferição do volume placentário, já que é mais rápida e prática (68).

Ao longo dos anos, a técnica foi sendo aprimorada e, por conseguinte, foram publicadas curvas de normalidade do volume placentário de acordo com as idades gestacionais, já que ele varia positivamente com essa variável. Em 2007, Zalud e Shaha apresentaram uma curva que incluía gestantes somente de 14 a 25 semanas, sem realizar controles como tabagismo (69). Em 2008, De Paula *et al.*(45), publicaram uma curva de normalidade de gestantes entre 12 e 40 semanas, mostrando não haver correlação com tabagismo e o índice de massa corpórea (IMC), portanto, uma curva bem completa. Em 2014, foram publicadas 2 curvas, uma por Moran *et al.* (70) e outra por Pomorski *et al.* (43). A primeira incluiu gestantes entre 12 semanas e 6 dias e 39 semanas e 5 dias, e a segunda, gestantes entre 22 e 41 semanas, porém não incluiu as pacientes com hábito de fumar, e com sobrepeso ou obesas. Em todas, foi utilizado o método VOCAL.

Em 1999, Pairleitner *et al.* (40) demonstraram a eficácia na associação da técnica 3D ao *power* Doppler a fim de se quantificar o fluxo sanguíneo em órgãos do corpo humano. Constataram tratar-se de técnica sensível a fluxos de baixa velocidade e pouco dependente do ângulo de insonação, destarte com ótimo proveito em obstetrícia. Realiza-se a captura em varredura do volume de interesse com uma sonda 3D e o software VOCAL, que calcula os índices vasculares, IV, IF e IVF, os quais representam a vascularização real do órgão estudado (40, 71).

A técnica passou a ser utilizada em diversos órgãos fetais, entre eles rins e pulmões (72, 73), assim como para a avaliação placentária (74-76). Ao longo dos anos, a técnica foi sendo testada de diversas formas e aperfeiçoada. No início, eram feitas as chamadas biópsias placentárias, as quais consistiam na captura de uma esfera da placenta, com análise da vascularização apenas nesse volume (44, 74, 75).

Alguns estudos realizaram as medidas de vascularização em cinco esferas em cada paciente, na tentativa de minimizar as possíveis diferenças de vascularização entre as regiões da placenta. Guiot *et al* (77) e Noguchi *et al*. (78) demonstraram que o IV e o IVF apresentaram alta variabilidade entre as esferas, além de a realização do exame demandar muito tempo. Lai *et al*. (79) e Negrini *et al*. (80) também encontraram diferenças significativas nos valores dos índices vasculares IV, IVF e IF, entre diferentes áreas da placenta, corroborando a desigualdade de perfusão regional placentária, assim como é visto histologicamente. Diante desses resultados, a captura do volume total placentário torna-se mais fidedigno da real vascularização desse tecido heterogêneo. Os estudos supracitados, que construíram curvas de normalidade de volume da placenta, estudaram, ao mesmo tempo, os índices de vascularização, fazendo a captura do órgão em sua totalidade (41, 43, 70, 76). A desvantagem ocorre principalmente no terceiro trimestre, devido ao tamanho e dificuldade em captar o volume total.

A reprodutibilidade, a variação inter e intraobservador também foram avaliadas e ratificadas (44, 46, 81-83). Para isso, é necessário que os parâmetros do aparelho de ultrassonografia estejam regulados sempre da

mesma forma como já foi publicado (41). Isso porque já foi demonstrado que, para a quantificação dos índices vasculares, alguns parâmetros influenciam nos resultados, entre eles, o *pulse repetition frequency* (PRF), ganho e potência real do *power* Doppler e profundidade (84-88).

Raine-Fenning *et al.* demonstraram *in vitro* que o ganho do *power* Doppler e a profundidade eram fatores que interferiam nos valores da vascularização, já que modificam o sinal de captura do *power* Doppler (84). Contudo, na tentativa de minimizar o efeito da profundidade, Pomorski *et al.* regularam o ganho individualmente em cada paciente (43). Como os índices de vascularização foram os mesmos, independentemente da localização da placenta, os autores sugeriram que pode ser uma técnica útil a fim de impedir que a distância entre o transdutor e o órgão interfira e altere os resultados. No entanto, no estudo não foram contempladas gestantes com IMC maior do que 25kg/m².

Como a placenta é um órgão muito vascularizado, onde ocorrem os processos de vasculogênese e angiogênese, em quase a totalidade do tecido, pode-se compreender que o desenvolvimento desse método não-invasivo, que possibilita a avaliação da angioarquitetura placentária, foi fundamental para o estudo desse órgão, a partir do qual, podem ter origem as diversas patologias materno-fetais. Assim, tornou-se uma técnica visada para o estudo da avaliação da função feto-placentária e predição de doenças provenientes de alterações nessas funções, a fim de se obter diagnóstico e terapêutica precoces.

3.4 – Avaliação da placenta pela ultrassonografia 3D e predição de desfechos adversos

Em diversos estudos, tanto o volume quanto os índices vasculares IV, IF e IVF foram comparados entre placentas de gestações normais e aquelas de gestações com desfechos adversos, entre eles, principalmente, a pré-eclâmpsia, a hipertensão gestacional e a restrição de crescimento fetal, ou seja, patologias que cursam com alteração da vascularização placentária. Dentre as diversas técnicas 3D que podem medir tais variáveis, a técnica VOCAL com rotação de 30 graus, com captura da placenta em seu volume total e com os parâmetros do *power* Doppler ajustados sempre com a mesma configuração, tendem a ser mais fidedignas da vascularização real da placenta avaliada (41, 45), e todos os estudos relatados abaixo contemplam essa padronização do método.

Hafner *et al.* testaram a hipótese de que a avaliação, entre 11 e 14 semanas, do volume e vascularização placentária, por meio do IV e IF, pode ser um método preditor de complicações na gravidez, como a pré-eclâmpsia, a hipertensão gestacional e a restrição de crescimento fetal. Nesse estudo, igualmente foram avaliados os índices vasculares da região miometrial de decídua. Foram avaliadas 383 gestações, e entre o grupo que desenvolveu pré-eclâmpsia (10 pacientes), tanto na placenta quanto no miométrio adjacente, viram-se reduzidos os valores de IV. As pacientes tabagistas não apresentaram diferenças significativas nos valores dos índices vasculares e, além disso, eles

não mostraram correlação com a localização da placenta. O IF apresentou correlação negativa com o IMC e com a profundidade (51).

Odeh *et al.*, com a intenção de estudar se há diferença, entre 11 e 13 semanas e 6 dias, no volume da placenta e nos seus índices vasculares, entre pacientes que desenvolveram pré-eclâmpsia, restrição de crescimento fetal ou ambos, compararam numa coorte prospectiva com 208 pacientes com as gestantes que não apresentaram essas comorbidades ao longo do estudo. Os resultados mostraram uma diminuição das médias do IV no grupo das 8 pacientes com diagnóstico de pré-eclâmpsia. Os autores, portanto, concluíram que a diminuição do IV mostrou ser um bom potencial preditor de pré-eclâmpsia (89).

Odibo *et al.* mostraram, em 388 gestantes, entre 11 e 14 semanas, que os índices vasculares placentários médios do IV e IVF foram mais baixos em gestações que evoluíram com pré-eclâmpsia (30 pacientes), porém não o foram nos casos que evoluíram com hipertensão gestacional (37 pacientes) ou restrição de crescimento fetal (31 pacientes). Os grupos foram controlados por IMC e localização da placenta. Observou-se, nesse estudo, efeito preditor do IV e IVF para pré-eclâmpsia. As taxas de detecção e de falso positivo foram de 44,8% e 22,6% para o IV e 44,8% e 22,1% para o IVF, respectivamente. Gestações complicadas por pré-eclâmpsia e restrição de crescimento fetal mostraram IF significativamente menor, quando comparado ao grupo controle e o volume médio da placenta não apresentou diferença significativa em nenhum grupo. Para avaliar a capacidade de predição de pré-eclâmpsia com os índices IV, IF e IVF, os autores utilizaram a curva ROC tendo encontrado valores

modestos (área sob a curva ROC = 0,71; 0,69 e 0,70, respectivamente), e concluem que é um método promissor para essa finalidade. Entretanto, ainda há a necessidade de mais estudos associando outras ferramentas, a fim de se desenvolver o rastreamento dessa patologia. O IV e IVF foram considerados os melhores modelos para prever pré-eclâmpsia, no entanto, existe ainda uma elevada taxa de falsos positivos. Os autores ainda relataram que os valores das médias dos índices vasculares são muito próximos entre os grupos comparados, apesar de existir diferença significativa entre eles no IV e IVF. Essa pode ser uma explicação do motivo de os resultados de predição serem modestos. Não houve diferença de resultados entre as pacientes tabagistas (49).

Pomorski *et al.* realizaram um estudo prospectivo com o objetivo de avaliar se existe diferença nos índices vasculares e volume placentários entre grupo de gestantes sem comorbidades que desenvolvem ou não fetos com restrição de crescimento fetal e, a partir dos achados, verificar se é possível usar essas variáveis como preditoras para esta morbidade. O trabalho incluiu, na amostra final, 55 gestantes normais, entre 29 e 42 semanas, e 20 que evoluíram com feto restrito, entre 29 e 40 semanas, excluindo pacientes com o hábito de fumar. Destaca-se uma importante diferença metodológica desse trabalho em relação à captura da placenta, pois, nesse caso o ganho do *power* Doppler foi regulado em cada paciente e, portanto, os grupos não foram controlados por IMC materno ou pela localização da placenta. Os resultados mostraram que o grupo com restrição de crescimento fetal apresentou médias significativamente menores de IV, IF, IVF e volume placentários. Os valores da área sob a curva ROC para predição de restrição de crescimento fetal foram

para IV, IVF, volume e IF, 0,825, 0,818, 0,795 e 0,712, respectivamente. Para especificidade de 80%, a sensibilidade de cada variável, naquela mesma ordem, foi 65%, 70%, 60% e 40%. Por conseguinte, os autores concluíram que o IV e o IVF são os melhores parâmetros com potencial para discriminar gestações de alto risco para desenvolver restrição de crescimento fetal (56).

Pimenta *et al.* compararam volume e índices vasculares placentários entre pacientes normais e hipertensas, no terceiro trimestre, utilizando o teste de análise de variância (ANOVA), em um estudo caso-controle prospectivo. As gestantes incluídas não poderiam ser tabagistas e ter IMC entre 18,5 e 24,5kg/m². As hipertensas (62 pacientes) foram divididas em grupos de hipertensão arterial crônica, pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superjuntada. Em uma amostra de 128 pacientes, as gestantes hipertensas apresentaram redução significativa do IV e do IVF, e esse achado foi mais pronunciado em pacientes com pré-eclâmpsia superajuntada. Além disso, eles não encontraram entre os grupos diferença no volume da placenta (54).

Arakaki *et al.* publicaram, em 2015, um estudo com o objetivo de avaliar a capacidade de predição de pré-eclâmpsia precoce e tardia com o uso do Doppler das artérias uterinas e do volume placentário, entre 11 e 13 semanas de gestação, uma vez que eles poderiam representar sinais ultrassonográficos de uma invasão trofoblástica alterada e insuficiente. A coorte prospectiva incluiu 1362 gestantes normotensas, das quais 10 evoluíram com pré-eclâmpsia precoce e 67 pacientes, com pré-eclâmpsia tardia. O grupo com pré-eclâmpsia precoce apresentou volume médio menor e os índices de pulsatilidade (IP) e índice de resistência médio das artérias uterinas maior do

que o grupo controle. Além disso, quando analisadas as duas variáveis em conjunto, o volume da placenta e IP das artérias uterinas, área sob a curva ROC foi de 0,832, e com $p = 0,025$ em comparação com o uso das variáveis em separado. A taxa de detecção foi de 67,5%, para 5% de falso positivo. Desse modo, tais variáveis combinadas com marcadores bioquímicos poderiam elevar a predição de pré-eclâmpsia precoce (90).

Em suma, os estudos demonstram que a ultrassonografia 3DPD é capaz de avaliar a vascularização placentária próxima do real (40, 88) e tem uma capacidade promissora na predição de desfechos patológicos relacionados com a placentação e a vascularização placentária prejudicadas, como ocorre em gestantes expostas à poluição atmosférica, situação que adiciona morbidades ao período gestacional. Por conseguinte, o objetivo do nosso estudo foi avaliar a influência da exposição individual à poluição do ar urbano sobre o volume e a vascularização placentários.

Casuística e Métodos

4 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente estudo faz parte de um projeto maior intitulado "Impacto das exposições à poluição atmosférica durante a vida intrauterina e pós-natal sobre a saúde respiratória da criança", o ProcriAR, uma coorte prospectiva que inclui a avaliação de gestantes e crianças com o objetivo de verificar os efeitos da poluição do ar na saúde do binômio materno- fetal e da criança. O projeto está vinculado ao INAIRA (Instituto Nacional de Análise Integrada de Risco Ambiental).

O projeto de pesquisa foi aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob o número 132/10 e pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Secretaria Municipal da Saúde da Prefeitura da cidade de São Paulo sob o número CAAE: 0205.0.162.162-10, parecer número 430/10. Os dados coletados, neste estudo, foram inseridos em um site (www.procriarsp.com.br) pelos diversos participantes. Foi também criado um logo para facilitar a identificação do projeto pelas gestantes e pelo restante dos pesquisadores (Figura 1).

O orçamento para a execução do projeto ProcriAR foi aprovado como parte do edital 15 CNPq/Fapesp - Instituto Nacional de Análise Integrada de Riscos Ambientais – INAIRA.

Figura 1 - Logo do projeto ProcriAR

No projeto ProcriAR, foram envolvidos médicos, nutricionistas, biomédicos e alunos de pós-graduação. O ProcriAR contou ainda com a ajuda dos funcionários do Ambulatório de Pré-Natal da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e de quatro Unidades Básicas de Saúde (UBS) da região do Butantã. As USB's do Jardim Boa Vista; Jardim São Jorge, Paulo VI e Vila Dalva situam-se no Distrito de Saúde Escola na cidade de São Paulo.

4.1 - Desenho do estudo

O presente subprojeto foi uma coorte prospectiva aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número 193/11 (Anexo 7.1), com a conveniente amostra recrutada do projeto ProcriAR, representada por 288 gestantes voluntárias, no primeiro trimestre, residentes no Distrito de Saúde Escola do Butantã na cidade de São

Paulo, todas de baixo risco, avaliadas no período de outubro de 2011 a janeiro de 2014.

Às gestantes foram convidadas a participar do estudo e aquelas que aceitaram assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 7.2). O estudo foi duplo-cego, já que a realização da avaliação ultrassonográfica ocorreu sem o conhecimento dos valores dos poluentes dosados, e vice-versa.

4.2 - Seleção e seguimento das pacientes

4.2.1 - Critérios de inclusão:

- Concordância prévia por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);
- Gestação única;
- Ausência de doenças maternas preexistentes;
- Ausência de malformações fetais;
- Idade gestacional no período entre 11 e 13 semanas e 6 dias, confirmada pela medida do comprimento cabeça-nádega (CCN) à ultrassonografia do primeiro trimestre;
- Ter o amostrador passivo individual (API) dentro do prazo de validade e em condições adequadas para análise.

4.2.2 - Critério de exclusão:

- Gestação gemelar detectada no exame ultrassonográfico;
- Malformação fetal detectada à ultrassonografia;
- Diagnóstico de abortamento ou morte fetal durante o acompanhamento;
- Doenças maternas diagnosticadas durante o seguimento;
- Mudança de endereço para fora da área de recrutamento;
- Desistência de participar do projeto.

4.3 - Recrutamento e dinâmica do projeto (Figura 2).

O recrutamento foi feito dentro do período de três anos, realizado por contato com as UBS's de interesse, e assim que um caso positivo de gestação fosse confirmado, a gestante era questionada sobre a participação no estudo. A idade gestacional (IG), calculada por meio da data da última menstruação, deveria ser inferior a 12 semanas, na data do recrutamento, para que, no dia da primeira avaliação, duas semanas após, elas chegassem com IG inferior a 13,86 semanas.

Após explicação detalhada sobre o estudo, era apresentado à gestante o TCLE e assinado caso concordasse em participar. Concomitantemente, a gestante recebia um cartão do projeto ProcriAR com a data da primeira avaliação no HCFMUSP, respondia a questionários de identificação, questões

socioeconômicas e inquérito domiciliar, e a respeito de seus antecedentes clínicos, assim como orientadas sobre os exames a serem realizados, como as ultrassonografias, coleta de sangue e espirometria, sendo os dois últimos para os outros subprojetos. O seu cadastro no site era realizado com as informações coletadas. Além disso, recebia um bilhete único para as despesas de transporte público para ir e voltar do HCFMUSP. O peso e altura foram medidos duas vezes e pela média de ambos, calculado o IMC materno.

Após a aceitação da gestante em participar, sua assistência pré-natal continuou a ser realizada na UBS. Porém alguns de seus exames ultrassonográficos foram agendados logo após o recrutamento, e realizados no HCFMUSP.

No Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) do Departamento de Patologia da FMUSP, os API's foram preparados e depois levados para as UBS's, para então serem entregues pelos agentes comunitários às respectivas gestantes que, mais uma vez, eram instruídas quanto ao seu uso correto (Figura 2).

Figura 2 – Dinâmica do projeto ProcriAR

4.4 - Métodos

4.4.1 - Coleta de dados

As gestantes carregavam os API's de NO₂ e O₃ em ocasião próxima e anterior à data da ultrassonografia e os devolviam, após o uso, no retorno ao Hospital das Clínicas. Os poluentes foram analisados separadamente de acordo com seus respectivos protocolos.

Em todas as pacientes selecionadas, foi realizado exame de ultrassonografia pela mesma operadora, a autora deste estudo. A avaliação

placentária de cada paciente foi feita à época da ultrassonografia morfológica de primeiro trimestre com o objetivo de avaliar a placenta e a morfologia do feto.

4.4.2 - Instrumento da coleta de dados

4.4.2.1 - Amostradores passivos Individuais de NO₂ e O₃.

O agente comunitário de saúde entregava o API na casa da paciente 7-18 dias antes da ecografia. As gestantes foram orientadas a usá-los fora da bolsa, durante todo o dia, e, durante a noite, deixar no quarto onde dormiria, ao lado da cama. Após esse período, os amostradores eram devolvidos no momento da realização da ultrassonografia, na Clínica de Medicina Fetal do Departamento de Obstetrícia da Universidade de São Paulo, Brasil (HCFMUSP), sendo então enviados ao Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Universidade de São Paulo, Brasil (LPAE / FMUSP), onde foram desmontados e armazenados até a análise. Caso a gestante não comparecesse às avaliações ou esqueciam de levar o API ao atendimento no HCFMUSP, ela era contatada e orientada a devolvê-lo na própria UBS, ou então o agente comunitário retirava-o na sua residência.

Os API's utilizados para a amostragem de NO₂ e de O₃ foram desenvolvidos no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (11, 15, 91, 92).

Os amostradores eram compostos por filtros de celulose (Figura 3), de 37 mm de diâmetro, da marca Energética, previamente tratados quimicamente, e acondicionados em embalagens plásticas, quatro tubos plásticos como os de filme fotográfico com o fundo cortado, acomodados em molde de tecido confeccionado especialmente para esse projeto (Figura 4).

Figura 3 - Filtros de celulose

Figura 4 - Amostrador passivo individual pronto para ser embalado

Cada paciente usou dois filtros de cada poluente. Amédia deles foi considerada como medida final para avaliação. Um folheto com instruções de uso era entregue para a gestante em conjunto com o API (Figura 5).

Instruções para uso do amostrador passivo individual

Esses tubos contendo filtros de papel servem para capturar a poluição a que a senhora esta sendo exposta.

Chegarão até você devidamente preparados, portanto não será necessário trocá-los de lugar ou manuseá-los.

Deve permanecer o tempo todo ao seu lado, seja em casa, no trabalho ou na rua pelo período de aproximadamente 12 dias.

O filtro pode ser preso fora da bolsa, roupa ou uniforme de trabalho. Não pode ser guardado dentro da bolsa ou armário. Caso não seja usado de forma correta, a amostragem precisará ser refeita.

Enquanto em casa, ele pode ser colocado sobre a mesa, na sala ou na cozinha de forma que a parte aberta fique virada para cima tomando ar. Quando for dormir, deixe-o no quarto ou no local em que for passar a noite.

Os filtros devem permanecer fora do alcance de crianças, não devem ser molhados, rasgados ou tocados.

Assim que retornar ao hospital para a ultrassonografia, a senhora devera levá-lo junto, **ainda usando-o**, para que seja entregue a pesquisadora responsável.

DATA DA ULTRASSONOGRAFIA

Maiores informações: Luciana Pastro Tel: XXXX-XXXX

Figura 5: Instruções para uso do amostrador passivo individual

Os poluentes foram avaliados separadamente de acordo com seus respectivos protocolos. Os filtros de NO₂ foram extraídos em até 24 horas, e analisados por espectrofotometria, caso não pudessem ser analisados ao mesmo tempo, poderiam ser congelados durante um período de 2 semanas (Figura 6). Pesquisas anteriores usaram o mesmo método para medir NO₂ (15, 91). Os filtros de O₃ poderiam ser analisados em qualquer momento, após a exposição, sendo calculada a diferença entre a refletância final e inicial dos filtros, que foram medidos antes e depois da exposição, respectivamente (11, 92) (Figura 7).

Figura 6 - Comparação visual entre os filtros de dióxido de nitrogênio antes e após a exposição. Filtros não danificados. ($\text{NO}_2 = 1142,2 \times \text{concentração de NO}_2 \text{ em ugml / tempo em dias}$).

Figura 7 - Comparação visual entre os filtros de ozônio antes e após a exposição. Filtros não danificados. ($O_3 = 2,1629 \times (\text{reflectância final} - \text{inicial}) + 92,857$) / tempo em dias)).

4.4.2.2 - Exame de ultrassonografia:

A avaliação rotineira morfológica preconizada no pré-natal foi realizada em todas as gestantes, e o CCN obtido segundo a técnica publicada por Hadlock (93).

As características maternas analisadas foram: índice de massa corpórea (IMC - peso / estatura²), medido no momento da avaliação ultrassonográfica, e o hábito de fumar, considerado positivo para qualquer número de cigarros relatado, além da paridade. As informações sobre as condições clínicas das gestantes e possível desenvolvimento de patologias eram retiradas do cartão de pré-natal realizado na UBS.

A avaliação placentária incluiu a sua localização, o volume placentário e os índices vasculares placentários: índice de vascularização (IV), índice de fluxo (IF) e o índice de vascularização sobre o de fluxo (IVF).

O exame morfológico do primeiro trimestre foi realizado em aparelhos da marca Voluson (E8 e Expert 730) e Toshiba, equipados com o transdutor curvilíneo abdominal 2D, da Clínica Obstétrica do HCFMUSP.

Todos os exames ultrassonográficos feitos para o estudo do volume e dos índices vasculares placentários, descritos acima, foram realizados no mesmo aparelho da marca e modelo Voluson 730 ExpertTM, equipado com o transdutor abdominal 3D, General-Eletric, Áustria, da Clínica Obstétrica do HCFMUSP.

O exame era iniciado com a paciente em decúbito dorsal a 45 graus, a fim de se evitar hipotensão (94), e realizada a ultrassonografia 2D com o transdutor convexo bidimensional de 3,5 MHz dos referidos aparelhos, sendo feita a análise morfológica, confirmação da idade gestacional e avaliação inicial da placenta quanto à sua localização e grau de maturação (Grannum, *et al*, 1979).

Ainda no mesmo momento, foi realizada a varredura 3D em tempo real com o transdutor convexo volumétrico de 4,0 a 8,0 MHz do aparelho Voluson 730 ExpertTM, para a avaliação tridimensional da placenta e análise dos índices de vascularização, empregando-se velocidade baixa e ângulo de 85 graus associado ao *power* Doppler, assegurando a captura da placenta em seu volume total. O ajuste do *power* Doppler foi o mesmo em todas as capturas, sendo configurado em modo prestabelecido na literatura (45): modo *angio*: cent; suave: 4/5; frequência: baixa; qualidade: 16; densidade: 6; realce: 16; balanço: GO150; filtro: 2; potência real: 2 dB; frequência de repetição de pulso (PRF): 0.9kHz (41). Em caso de presença de artefatos durante a aquisição do

volume devido ao movimento do feto, o processo de captura era repetido até o alcance de uma imagem satisfatória. Após a varredura tridimensional, a imagem ultrassonográfica era apresentada em três diferentes planos ortogonais: um longitudinal (superior à esquerda da tela), um transversal (superior à direita da tela) e um frontal (ou coronal, inferior à esquerda da tela). Logo após, selecionava-se a tecla VOCAL do aparelho com modo de delimitação manual e ângulo de rotação de 30 em 30 graus, e elege-se um plano ortogonal como referencial, onde são ajustados os polos superior e inferior e inicia-se o delineamento manual da placenta. Os contornos do órgão a ser estudado foram demarcados com a ajuda de um calibrador de medidas. A placenta é rodada em torno de seu eixo em seis planos consecutivos, e dessa etapa, por meio de uma análise computadorizada. O programa fornece a imagem volumétrica tridimensional (Figura 8), com o volume representado em cm^3 e os índices de vascularização: IV, em porcentagem, IF e IVF, que constituem o histograma *power Doppler* tridimensional (Figura 9).

Figura 8- Captura da placenta pela ultrassonografia 3D associada ao *power* Doppler com o método VOCAL.

Figura 9 - Cálculo automático do volume placentário e dos índices de vascularização (histograma *power* Doppler tridimensional) pela ultrassonografia 3D associada ao *power* Doppler com o método VOCAL

O volume tridimensional é formado por unidades básicas chamadas *voxels* (*volume element*). O *voxel* contém todas as informações sobre a escala de cinza e de cor. O índice de vascularização, expresso em porcentagem, mostra a relação entre o número de *voxels* coloridos e o número total de *voxels* do volume estudado, representando os vasos sanguíneos, portanto, a porcentagem de tecido vascularizado. O índice de fluxo mede os *voxels* coloridos e mostra a velocidade do fluxo expressa em número absoluto. O índice de vascularização e fluxo reflete a combinação das informações dos dois índices anteriormente descritos.

Dessa forma, o volume e os índices de vascularização placentária foram associados aos níveis de poluentes aos quais cada gestante foi exposta, a fim de se analisar se há correlação entre tal exposição e alterações placentárias vasculares.

4.5 - Análise estatística

A amostra do projeto inicial foi de 400 gestantes. Este subprojeto fez parte de uma amostra de conveniência dentro do estudo.

Na análise estatística inicial, foram utilizadas medidas descritivas como média, mediana, mínimo, máximo e desvio-padrão para as variáveis quantitativas, conforme o caso. Os dados qualitativos foram descritos por meio de frequências e porcentagens absolutas e relativas. A distribuição normal foi avaliada pelos testes de Shapiro-Wilk por meio dos gráficos de histograma e valor observado versus valor esperado. O teste de coeficiente de correlação de

Spearman foi utilizado para quantificar a relação entre duas variáveis quantitativas. O teste T de *student* foi utilizado para comparação entre as médias dos índices vasculares e volume placentários entre pacientes tabagistas e não-tabagistas, entre placentas com localização posterior e não-posterior e ainda entre as pacientes nulíparas e múltiparas.

Modelos de regressão linear múltiplos foram ajustados para avaliar o efeito dos poluentes NO₂ e O₃ na vascularização e volume placentários, no primeiro trimestre. Em cada modelo, uma dessas variáveis foi considerada como resposta: volume placentário, IV, IF e IVF. A transformação logarítmica para as variáveis resposta foi necessária para a suposição de distribuição normal. As variáveis controle utilizadas foram a idade gestacional, o IMC, o tabagismo, a paridade e a localização da placenta.

Como resultado, apresentamos o modelo final, que teve apenas as variáveis que foram consideradas significativas, isto é, valor de p inferior a 0,05. Expusemos também os resultados dos modelos com todas as variáveis, incluindo as que não apresentaram resultados significativos sobre as variáveis placentárias.

Para cada modelo ajustado, a análise dos resíduos foi realizada para verificar os pressupostos do modelo de regressão linear. Não havia nenhuma evidência de violação dos pressupostos do modelo. Análise de *outliers* também foi realizada para identificar pontos de influência no modelo ajustado e, na ocasião em que foram detectados pontos influentes, foi ajustado o modelo sem esses pontos, mas nenhuma mudança foi feita em resultados de inferência.

Os resultados finais dos modelos ajustados foram apresentados por meio do coeficiente estimado com intervalo de confiança de 95% e dos coeficientes padronizados. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi inferior a 0,05. O software utilizado foi o SPSS para Windows versão 22.

Resultados

5 – RESULTADOS

5.1 - Resultados Gerais

O estudo recrutou 288 pacientes, das quais foram excluídas: 8 devido a abortamento; 21 pacientes compareceram ao exame ultrassonográfico inicial, porém não retornaram à época correta, ou seja, entre 11 semanas e 13 semanas e 6 dias; e, por fim, não foi possível medir os poluentes nos filtros de 30 pacientes, pois elas não os utilizaram de maneira adequada, danificando o filtro ou não seguindo corretamente as recomendações de como transportá-lo.

Após tais exclusões pertinentes, a amostra final no primeiro trimestre foi de 229 pacientes (Figura 10).

Figura 10 – Fluxograma de pacientes no primeiro trimestre

5.2 - Análise Estatística

As características descritivas das variáveis avaliadas no primeiro trimestre estão mostradas na tabela 1:

Tabela 1 - Características descritivas dos dados coletados no primeiro trimestre (n=229)

Características Descritivas	Média ± DP /n(%)	Mediana (Mínimo- Máximo)
IMC (kg/m²)	26,11 ± 5,6	25,06 (16,3 - 46,3)
Tabagismo		
Não	193 (84,3%)	-
Sim	36 (15,7%)	-
Idade Gestacional (semanas)	12,5 ± 0,64	12,5 (11– 13,86)
Paridade		
Nulípara	122 (53,3%)	-
Multípara	107 (46,7%)	-
Local da Placenta		
Não – Posterior	125 (54,6%)	-
Posterior	104 (45,4%)	-
Volume placentário (cm³)	52,2 ± 20,3	48,5 (19 – 134,3)
IV (%)	7,7 ± 6,2	6,0 (0,6 – 39,2)
IF	35,7 ± 5,4	35,3 (23,2 – 57,8)
IVF	2,7 ± 2,0	2,0 (0,1 – 12,5)
NO₂ (ug/m3)	40,50 ± 17,72	40,48 (7,12 – 92,13)
O₃ (ug/m3)	8,22 ± 1,15	8,09 (5,32 – 13,79)

DP = desvio-padrão; IMC = Índice de Massa Corpórea; IV = índice de vascularização; IF = índice de fluxo; IVF = índice de vascularização e fluxo; NO₂ = dióxido de nitrogênio; O₃ = ozônio

A análise de correlação de Spearman entre as variáveis placentárias (volume, IV, IF e IVF), as variáveis controle (IG e IMC) e os poluentes (NO₂ e O₃), estão demonstradas nas tabelas a seguir.

Na tabela 2 abaixo, mostramos os resultados entre os logaritmos do volume e índices vasculares placentários e suas correlações com a idade gestacional:

Tabela 2 – Coeficiente de correlação de Spearman entre o logaritmo das variáveis placentárias do primeiro trimestre e a idade gestacional

	Coeficiente de correlação
Log VOLUME ¹	0,475
Log IV ¹	0,008
Log IF ¹	0,063
Log IVF ¹	0,027

Log = logaritmo; IV = índice de vascularização; IF = índice de fluxo; IVF = índice de vascularização e fluxo; 1 = primeiro trimestre.

O volume placentário está correlacionado positivamente com a idade gestacional e os índices vasculares não apresentaram correlação significativa.

Na tabela 3, mostramos as correlações entre o logaritmo das variáveis placentárias e o IMC:

Tabela 3 – Coeficiente de correlação de Spearman entre o logaritmo das variáveis placentárias e o IMC no primeiro trimestre

	Coeficiente de correlação
Log VOLUME ¹	-0,059
Log IV ¹	0,244
Log IF ¹	-0,374
Log IVF ¹	0,293

Log = logaritmo; IV = índice de vascularização; IF = índice de fluxo; IVF = índice de vascularização e fluxo; 1 = primeiro trimestre.

Os índices vasculares apresentaram correlação fraca com o IMC.

Na tabela 4, mostramos a correlação entre as medidas dos poluentes NO₂ e O₃ dosados no primeiro trimestre. Observamos que não houve correlação entre eles.

Tabela 4 - Coeficiente de correlação de Spearman entre os poluentes dosados no primeiro trimestre

	O₃
NO₂	Coeficiente de correlação = 0,088

NO₂ = dióxido de nitrogênio; O₃ = ozônio.

Na tabela 5, estão demonstradas as correlações entre os poluentes e as variáveis resposta.

Tabela 5 – Coeficiente de correlação de Spearman entre o logaritmo das variáveis placentárias e a exposição aos poluentes no primeiro trimestre

	NO₂(1T)	O₃(1T)
Log VOLUME ¹	0,116	-0,099
Log IV ¹	-0,149	-0,086
Log IF ¹	-0,015	-0,058
Log IVF ¹	-0,153	-0,099

Log = logaritmo; IV = índice de vascularização; IF = índice de fluxo; IVF = índice de vascularização e fluxo; 1 = primeiro trimestre; 1T = primeiro trimestre.

Observamos que não há correlações significativas entre os poluentes e as variáveis placentárias no primeiro trimestre.

Não houve diferença significativa entre as médias dos valores dos índices vasculares e volume placentários nos grupos de pacientes tabagistas e não tabagistas e entre as placentas com localização não-posterior em comparação com posterior. Os resultados estão relatados nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Apresentação das médias e desvio-padrão do volume e índices placentários em gestantes tabagistas e não-tabagistas no primeiro trimestre

	Média ± DP	p
Volume Placentário (cm3)		
Não-Tabagista (n=193)	51,43 ± 18,51	0,323
Tabagista (n=36)	56,31 ± 28,14	
IV (%)		
Não-Tabagista (n=193)	7,47 ± 5,83	0,300
Tabagista (n=36)	8,94 ± 7,99	
IF		
Não-Tabagista (n=193)	35,64 ± 5,59	0,446
Tabagista (n=36)	36,40 ± 4,72	
IVF		
Não-Tabagista (n=193)	2,63 ± 1,93	0,245
Tabagista (n=36)	3,19 ± 2,71	

DP = desvio-padrão; IV = índice de vascularização; IF = índice de fluxo; IVF = índice de vascularização e fluxo; *p*-valores para o teste t de *Student*

Tabela 7 – Apresentação das médias e desvio-padrão do volume e índices placentários em placentas não-posterior e posterior no primeiro trimestre

	Média ± DP	p
Volume Placentário (cm3)		
Não-Posterior (n=125)	50,64 ± 19,54	0,204
Posterior (n=104)	54,07 ± 21,18	
IV (%)		
Não-Posterior (n=125)	7,25 ± 5,38	0,230
Posterior (n=104)	8,24 ± 7,09	
IF		
Não-Posterior (n=125)	35,53 ± 4,99	0,489
Posterior (n=104)	36,04 ± 5,99	
IVF		
Não-Posterior (n=125)	2,58 ± 1,87	0,273
Posterior (n=104)	2,88 ± 2,29	

DP = desvio-padrão; IV = índice de vascularização; IF = índice de fluxo; IVF = índice de vascularização e fluxo; *p*-valores para o teste t de *Student*

Na tabela 8, abaixo apresentamos as médias e desvio-padrão do volume e índices vasculares placentários dos grupos de gestantes nulíparas e multíparas, e observamos que houve diferença significativa entre o IV e o IVF, com valores maiores entre as multíparas, no primeiro trimestre.

Tabela 8 – Apresentação das médias e desvio-padrão do volume e índices placentários em gestantes nulíparas e multíparas no primeiro trimestre

	Média ± DP	p
Volume Placentário (cm3)		
Nulíparas (n=122)	51,32 ± 17,72	0,492
Multíparas (n=107)	53,20 ± 22,99	
IV (%)		
Nulíparas (n=122)	6,80 ± 5,88	0,020
Multíparas (n=107)	8,72 ± 6,47	
IF		
Nulíparas (n=122)	35,57 ± 5,56	0,576
Multíparas (n=107)	35,98 ± 5,36	
IVF		
Nulíparas (n=122)	1,97 ± 1,97	0,017
Multíparas (n=107)	3,06 ± 2,15	

DP = desvio-padrão; IV = índice de vascularização; IF = índice de fluxo; IVF = índice de vascularização e fluxo; p-valores para o teste t de *Student*

5.2.1 - Respostas das variáveis placentárias aos poluentes:

Expusemos, na tabela 9, abaixo, os resultados dos modelos de regressão linear múltipla da análise do efeito dos poluentes sobre as variáveis placentárias, incluindo também as variáveis as quais não apresentaram estatisticamente resultados significativos.

Tabela 9 – Estimativas dos coeficientes e valores de p dos modelos de regressão linear múltipla no primeiro trimestre

Covariáveis	Coeficiente (B)	IC 95% para B	Coeficiente Padronizado (beta)	p-valor
Log VOLUME				
NO ₂	0,002	(- 0,001 - -0,004)	0,070	0,246
O ₃	0,006	(-0,033 -0,045)	0,018	0,759
IMC	-0,007	(-0,015 – 0,001)	-0,099	0,107
Local	0,065	(-0,026 – 0,155)	0,084	0,161
IG	0,274	(0,204 – 0,345)	0,459	<0,001*
Paridade	0,030	(-0,065 – 0,125)	0,039	0,530
Tabagismo	-0,024	(-0,151 – 0,103)	-0,023	0,711
Log IV				
NO ₂	- 0,007	(- 0,013 - -0,001)	- 0,153	0,020*
O ₃	0,009	(-0,079 -0,096)	0,013	0,842
IMC	0,038	(0,020 – 0,056)	0,268	<0,001*
Local	0,067	(-0,135 – 0,269)	0,042	0,513
IG	0,034	(-0,123 – 0,191)	0,027	0,670
Paridade	0,123	(-0,089 – 0,335)	0,077	0,253
Tabagismo	-0,002	(-0,285 – 0,281)	-0,001	0,989

Tabela 9 – Estimativas dos coeficientes e valores de p dos modelos de regressão linear múltipla no primeiro trimestre

Log IF				
NO ₂	<0,001	(- 0,001 - 0,001)	0,006	0,927
O ₃	-0,010	(-0,026 -0,005)	-0,079	0,197
IMC	-0,011	(-0,015 – -0,008)	-0,430	<0,001*
Local	-0,002	(-0,038 – 0,034)	-0,007	0,909
IG	0,020	(-0,009 – 0,048)	0,084	0,173
Paridade	0,040	(0,002 – 0,078)	0,135	0,037*
Tabagismo	0,015	(-0,036 – 0,065)	0,035	0,573
Log IVF				
NO ₂	- 0,007	(- 0,013 - -0,001)	- 0,151	0,024*
O ₃	-0,001	(-0,091 -0,089)	-0,002	0,981
IMC	0,026	(0,008 – 0,045)	0,185	0,006*
Local	0,061	(-0,146 – 0,268)	0,038	0,563
IG	0,060	(-0,102 – 0,221)	0,048	0,469
Paridade	0,158	(-0,059 – 0,373)	0,098	0,153
Tabagismo	0,011	(-0,280 – 0,302)	0,005	0,940

IC = intervalo de confiança; Log = logaritmo; IG = Idade Gestacional; IMC = índice de massa corpórea; IV = índice de vascularização; IF = índice de fluxo; IVF = índice de vascularização e fluxo; NO₂ = dióxido de nitrogênio; O₃ = ozônio; 1 = primeiro trimestre; * = p-valor estatisticamente significante.

Na tabela 10, estão descritos os modelos finais das análises de regressão linear múltipla entre o logaritmo das variáveis placentárias e os poluentes, assim como as variáveis controle com p-valor menor do que 0,05.

Dessa forma, podemos observar que o NO₂ apresenta um efeito negativo sobre o IV (p=0,013 e beta= -0,158) e sobre o IVF (p = 0,015 e beta= -0,157).

Não houve influência do NO₂ e O₃ sobre o IF e volume placentários.

Observamos que, com relação às variáveis controle, houve associação positiva do volume com a idade gestacional. Além disso, o IMC apresentou efeito positivo sobre o IV e o IVF e, negativo sobre o IF. A multiparidade apresentou efeito positivo sobre o IF.

Tabela 10 – Estimativas dos coeficientes e valores de p dos modelos finais de regressão linear múltipla no primeiro trimestre

Covariáveis	Coeficiente (B)	IC 95% para B	Coeficiente Padronizado (beta)	p-valor
Log VOLUME ¹				
IG	0,276	(0,207 - 0,345)	0,462	< 0,001*
Log IV ¹				
NO ₂	- 0,007	(- 0,013 - - 0,002)	- 0,158	0,013*
IMC	0,040	(0,023 – 0,058)	0,284	< 0,001*
Log IF ¹				
IMC	-0,011	(- 0,015 - - 0,008)	-0,430	< 0,001*
Paridade	0,043	(0,006 – 0,079)	0,142	0,023*
Log IVF ¹				
NO ₂	- 0,007	(- 0,013 - -0,001)	- 0,157	0,015*
IMC	0,030	(0,011 - 0,048)	0,206	0,002*

IC = intervalo de confiança; Log = logaritmo; IG = Idade Gestacional; IMC = índice de massa corpórea; IV = índice de vascularização; IF = índice de fluxo; IVF = índice de vascularização e fluxo; NO₂ = dióxido de nitrogênio; O₃ = ozônio; * = p-valor estatisticamente significante.

As equações matemáticas para o primeiro trimestre derivadas dos modelos de regressão linear múltiplo são as seguintes, para o logaritmo do volume placentário, IV, IF e IVF, respectivamente:

$$\text{Log Volume da placenta} = 0,423 + 0,276 \times IG$$

$$\text{Log IV} = 0,985 + (-0,007 \times NO_2) + 0,040 \times IMC$$

$$\text{Log IF} = 3,842 + (-0,011 \times IMC)$$

$$\text{Log IVF} = 0,229 + (-0,007 \times NO_2) + 0,030 \times IMC$$

Por meio da análise das tabelas acima, podemos perceber que a exposição a altos níveis de NO_2 , no primeiro trimestre de gestação, foi significativamente associado a níveis mais baixos de índices de vascularização placentária no primeiro trimestre.

Discussão

6 - DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo realizado a fim de se avaliar a exposição individual da gestante à poluição do ar e seus efeitos sobre os índices vasculares e volume placentários, medidos por ultrassonografia 3D associada ao *power Doppler*, no primeiro trimestre da gravidez. No presente estudo, a exposição a altos níveis de NO₂ teve influência negativa sobre o índice de vascularização e sobre o índice de vascularização e fluxo. Essa constatação sugere que a vascularização placentária pode ser prejudicada pela exposição à poluição do ar em concentrações ambientais normais, especificamente a NO₂, que se correlaciona bem com outros poluentes primários e é um bom marcador da poluição urbana (95, 96).

Com efeito, NO₂ e O₃ foram selecionados como marcadores de exposição à poluição ambiente por várias razões. Em primeiro lugar, os amostradores passivos individuais poderiam ser usados sem incomodar as atividades diárias das pacientes que participaram do estudo. Em segundo lugar, apesar de a poluição atmosférica ser uma mistura complexa de poluentes, o NO₂ é um poluente produzido por quase todos os processos de combustão e correlaciona-se bem com outros poluentes primários, como MP e CO. Portanto, acaba sendo um marcador apropriado de poluição urbana, além de ter sido demonstrado como um bom indicador da exposição à poluição do tráfego de veículos motorizados (95, 96). O ozônio representa um bom estimador da exposição aos poluentes gerados por processos fotoquímicos.

Assim, NO₂ e O₃ foram considerados, neste estudo, como estimadores representantes, ou seja, *proxy* da mistura complexa que compõe a poluição urbana. Detalhes das análises foram publicadas pelo mesmo grupo de pesquisadores LPAE (11, 91, 97).

Além disso, o amostrador individual nos permite identificar o efeito de cada poluente sobre as variáveis placentárias, já que não houve correlação entre as medidas de NO₂ e O₃, assim como Ritz et al. publicaram utilizando as estações fixas e o modelo de "land use regression" para medição (98). O ozônio é um poluente secundário proveniente de uma reação que depende do NO₂, todavia está sujeito às condições climáticas, como nebulosidade e umidade, pois sua formação ocorre na presença de luz solar, e já o NO₂ depende particularmente da emissão veicular. Dessa forma, é difícil estabelecer uma relação exata entre eles e, na cidade de São Paulo, não há uma tendência específica (9).

Diversos estudos clínicos realizados em todo o mundo têm demonstrado a hipótese de que a poluição do ar causa danos à saúde e, em particular, no período gestacional, tendo como uma das causas prejuízo no funcionamento da placenta (1, 25, 60). Mecanismos possíveis para essa associação incluem estresse oxidativo, inflamação, alterações sistêmicas no hematócrito e viscosidade do sangue, coagulação, disfunção endotelial e respostas hemodinâmicas, podendo haver consequente placentação inadequada (28, 29, 60, 99).

A placentação adequada e seu consequente bom funcionamento são essenciais para uma gestação normal, ou seja, a insuficiência desses

processos, os quais podem ser refletidos por alterações nos marcadores de crescimento e função placentária, representa um fator de risco para resultados adversos fetais (28, 65). Em 2012, Van den Hooven *et al.* mostraram que a exposição materna a partículas de MP₁₀ e NO₂ foi associada com mudanças nos níveis de sFlt-1 e PlGF, no momento do parto, mudanças essas consistentes com um estado antiangiogénico (26). Essas alterações poderiam influenciar o desenvolvimento da placenta ao diminuir sua vascularização, o que pode ser demonstrado pela avaliação ultrassonográfica 3DPD, sendo, portanto, coerente com os resultados do presente trabalho.

Esses resultados são consistentes com efeitos experimentais já publicados (28, 29). Veras *et al.* (28) mostraram que ratas gestantes expostas à poluição do ar, em comparação com aquelas não expostas, apresentaram a diminuição da vascularização no lado materno da placenta, e da resistência ao fluxo no lado fetal, uma provável adaptação fetal na tentativa de manter o fluxo adequado. De Melo *et al.* (29), por sua vez, demonstraram que ratas gestantes expostas à poluição do ar, antes e durante a gravidez, obtiveram um aumento de interleucina-4 na porção fetal da placenta, sugerindo uma resposta placentária anti-inflamatória ao processo inflamatório desencadeado previamente à gestação e induzido pelos poluentes.

Por conseguinte, no presente estudo, conseguiu-se demonstrar por meio da ultrassonografia 3DPD variação da vascularização placentária que diminuiu de acordo com níveis individuais mais elevados de exposição materna à poluição atmosférica, corroborando nossa hipótese, baseada em estudos epidemiológicos e experimentais. A técnica ultrassonográfica 3DPD tem sido

extensivamente avaliada em inúmeras publicações, as quais mostraram bons níveis de reprodutibilidade intra e interobservadores (46, 81, 83). Contudo, é fundamental a necessidade de padronização dos parâmetros do *power* Doppler, já que muitos deles, especialmente, o ganho, o PRF e a potência podem gerar artefatos e influenciar os resultados dos índices vasculares avaliados (84-86, 88). Dessa forma, é importante ressaltar que a quantificação do fluxo placentário e da vascularização pela técnica 3DPD podem variar com os presets do aparelho de ultrassom. Em nosso estudo, os presets foram fixados em todas as avaliações de acordo com a literatura (41).

Outro fator já conhecido que pode influenciar os resultados dos índices vasculares é a distância entre a sonda e o volume de interesse. No presente trabalho, essa influência foi controlada usando o IMC e a localização da placenta, ambos relacionados com a profundidade da placenta (85). Quando os presets são fixos e a distância entre a sonda e a estrutura avaliada é levada em conta, essa técnica tem uma boa reprodutibilidade, podendo representar assim o verdadeiro fluxo e vascularização do órgão (46, 72, 81, 88, 100).

Na literatura, já foi demonstrado que o IMC pode influenciar o método *power* Doppler, portanto, os resultados dos índices vasculares (51). Hafner *et al.*, ao estudar o método 3DPD para predição de hipertensão na gestação, mostraram que o IF tem uma correlação negativa de -0,133 com o IMC (51). Em nosso estudo, o coeficiente de correlação entre IF e IMC foi -0,374. Além disso, no modelo de regressão linear, os três índices de vascularização placentária apresentaram uma relação linear com o IMC, sendo negativo para o IF, e positivo para o IV e IVF. Martins *et al.*, em um trabalho experimental,

utilizando os valores de IVF, observaram que superfícies com líquido podem gerar sinais de *power* Doppler, os quais aumentam com a distância entre o probe e o órgão avaliado, também dependendo do PRF, mesmo não existindo um fluxo real (85). Essa propriedade do ambiente líquido pode explicar porque obtivemos um aumento no IV e IVF em IMC mais elevados. Odibo *et al.*, em um estudo também para avaliar o método 3DPD como preditor de hipertensão na gestação e restrição de crescimento fetal, utilizaram o IMC e a localização da placenta como variáveis controles, incluindo-os na fórmula da regressão logística (49).

A localização da placenta é outro fator que já foi discutido na literatura. A maioria dos trabalhos mostram não haver variação significativa dos índices vasculares com a placenta em posição anterior ou posterior (41, 49, 51, 77). Contudo, alguns estudos optaram por incluir somente placenta anterior, em suas análises, o que não seria ideal na busca pela utilização clínica da técnica 3DPD (78, 101). Durante a realização da captura do volume placentário, quando a placenta se encontra posteriormente, podemos fazer uma leve inclinação lateral do transdutor, a fim de se evitar artefatos gerados pelos movimentos do feto ou do próprio líquido amniótico, além de sombras e atenuação dos feixes de ultrassom principalmente pelos ossos fetais e, dessa forma, evitando falsos resultados nos índices vasculares. Todavia, mesmo assim, optamos por levar em consideração essa variável como controle, na tentativa de retirar o máximo de efeitos que pudessem influenciar no sinal do *power* Doppler e, por conseguinte, na vascularização placentária, já que foi demonstrado que a distância entre o transdutor e o órgão estudado pode alterar esse sinal. Os nossos resultados no primeiro trimestre não foram

significativos, ou seja, não houve diferença entre as médias nos índices vasculares entre placentas anteriores e posteriores, e não obtivemos diferença significativa no modelo de regressão linear.

A paridade foi utilizada em dois estudos. Hafner *et al.* encontraram correlações positivas entre a paridade e o IF e IV (51), assim como Zalud *et al.* (101) Em nossas análises estatísticas, as médias do IV e IVF das pacientes múltiparas também foram maiores e significativas estatisticamente e, na análise de regressão linear, o IF mostrou variar positivamente com a multiparidade.

O volume placentário está correlacionado positivamente com a idade gestacional e os índices vasculares não apresentam correlação, achados já demonstrados na literatura (41, 45). Além disso, a idade gestacional apresenta influência positiva no modelo de regressão linear sobre o volume placentário, como já foi demonstrado pela literatura e faz sentido fisiologicamente, tanto que a idade gestacional deve ser utilizada como controle em todos os modelos de regressão linear múltipla que tenham o volume da placenta como variável resposta.

O tabagismo não mostrou correlação significativa com os índices placentários. No entanto, existem estudos mostrando que o ato de fumar compromete a vasculatura placentária, sendo já conhecido que gestantes tabagistas mostraram menor quantidade de tecido do parênquima placentário devido, principalmente, à redução no espaço intervilo e de vilosidades terminais e, conseqüentemente, resultando uma diminuição de volume e área de superfície capilar (102). Dessa forma, optamos pela utilização dessa

variável como controle na análise de regressão linear. Rizzo *et al.*, em um trabalho com gestantes fumantes, divididas em grupos de acordo com o número de cigarros fumados por dia, comparadas com um grupo controle de gestantes não fumantes, mostraram que 10 ou mais cigarros por dia influenciaram negativamente todos os índices vasculares placentários avaliados pela técnica 3DPD (102). Em nosso estudo, não quantificamos o número de cigarros consumidos por dia, considerando tabagista aquela gestante que relatava consumo de qualquer quantidade de cigarro na gestação. Esse fato pode ter interferido na ausência de influência do tabagismo nos índices vasculares placentários observados em nosso estudo.

Uma limitação do estudo é a falta de um grupo controle em um centro não-urbano, ou seja, uma região com baixos níveis de poluição atmosférica. No entanto, como a exposição à poluição do ar foi medida usando filtros individuais, os diferentes hábitos de vida levaram a exposições de diferentes concentrações de poluentes para cada paciente avaliada (57). Dessa forma, as gestantes que moram na mesma área podem estar expostas a diferentes níveis de toxicidade dos poluentes, a depender da sua rotina diária, atividade ocupacional, meio de transporte e tempo em congestionamentos. Além disso, a literatura mostrou que, durante a gestação, cerca de 30% das mulheres chegam a trocar de endereço residencial (103), situação que não interfere nas medidas dos poluentes dosados com a avaliação individual. Esse monitoramento preciso tornou-se possível com o desenvolvimento dos amostradores passivos individuais, os quais ainda permitem avaliar a poluição dos ambientes internos, pois estão durante todo o tempo com o indivíduo.

Outra limitação foi não avaliar a histologia da placenta e a influência da poluição atmosférica em sua vascularização real. No entanto, já que os índices vasculares da placenta podem se correlacionar com vascularização e fluxo reais (40, 71, 88), os nossos resultados sugerem que tais elementos estão diminuídos quando a mãe está exposta a valores mais elevados de NO₂. O prejuízo na vascularização placentária pode ser a causa subjacente do crescimento fetal restrito e dos resultados adversos da gestação, os quais já foram mostrados estarem relacionados à exposição a níveis mais elevados de poluição atmosférica, tanto previamente quanto durante o período gestacional (16, 19-24, 26, 104).

Este foi o primeiro estudo que avaliou a vascularização placentária com a técnica ultrassonográfica 3DPD e suas correlações com níveis de exposições individuais das gestantes à poluição atmosférica. Por meio dos resultados mostrados, aliados aos achados já existentes na literatura, abrimos a perspectiva futura de uma investigação placentária em diversos âmbitos sobre os efeitos causados pelos poluentes, como o estudo dos fatores angiogênicos, a histologia da placenta e até o aprimoramento e padronização do método ultrassonográfico 3DPD.

Conclusões

7– CONCLUSÕES

O presente estudo, realizado em gestantes de baixo risco, permitiu concluir que a exposição individual a níveis mais elevados de NO₂ apresentou efeito negativo sobre o IV e IVF placentários, e não apresentou efeito sobre o IF e volume placentários, avaliados pela ultrassonografia 3DPD entre 11 semanas e 13 semanas e 6 dias.

Não houve efeito significativo da exposição ao O₃ sobre as variáveis placentárias estudadas.

8 - ANEXOS

8.1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10/08/2011, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 193/11 intitulado: "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS EXPOSIÇÕES DO BINÔMIO MATERNO-FETAL À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA NA CIDADE DE SÃO PAULO." apresentado pelo Departamento de OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Rossana Pulcineli Vieira Francisco
Pesquisador (a) Executante: Luciana Duzolina Manfré Pastro

CEP-FMUSP, 16 de Agosto de 2011.

Prof. Dr. Marcelo Zugaib
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
Obstetrícia e Ginecologia
FMUSP

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep_fmusp@hcnnet.usp.br

CIÊNCIA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24 de Abril de 2013, TOMOU CIÊNCIA do(s) documento(s) abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº 193/11, intitulado: "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS EXPOSIÇÕES DO BINÔMIO MATERNO-FETAL À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA NA CIDADE DE SÃO PAULO." apresentado pelo DEPARTAMENTO DE OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA.

•Inclusão das pesquisadoras Lisandra Stein Bernardes, Karen Hettfleisch e Mariana Azevedo Carvalho.

Pesquisador (a) Responsável: Rossana Pulcineli Vieira Francisco

CEP-FMUSP, 29 de Abril de 2013.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

8.2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – “Impacto das exposições à poluição durante a vida intra-uterina e pós-natal sobre a saúde respiratória da criança”

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME:

SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

2.RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....

SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA "Impacto das exposições à poluição atmosférica durante a vida intra-uterina e pós-natal sobre a saúde respiratória da criança"

PESQUISADOR: Sandra Elisabete Vieira (Médica pediatra do Instituto da Criança, responsável pelo projeto).

CARGO/FUNÇÃO: Médica - docente. Inscrição no Conselho Regional N°57724

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Pediatria da FMUSP

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☐	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	x	RISCO MAIOR	☐

3.DURAÇÃO DA PESQUISA : 42 meses

A poluição do ar pode causar problemas respiratórios nas crianças. Este estudo tem o objetivo de analisar os efeitos da poluição do ar respirado pela gestante e pelas crianças no primeiro ano de vida sobre a saúde da mãe, da criança e o desenvolvimento de infecções respiratórias. Queremos analisar a exposição da gestante a gases produzidos por indústrias e automóveis e também à fumaça de cigarro. Para isto, convidamos a senhora e seu filho a participarem deste estudo.

Serão colocados filtros (papel especial) em pequenos crachás entregues durante consultas de rotina ou na sua casa. Os crachás podem ser presos à roupa, bolsa ou sacola para que permaneçam o mais próximo possível do seu corpo. por 15 dias seguidos e serão trocados a cada 3 meses durante a gestação. A senhora irá realizar 3 exames de ultrassonografia durante a gravidez. Esse exame será feito da forma rotineira, no Hospital das Clínicas, para isso o projeto arcará com os custos das suas idas e retornos ao Hospital das Clínicas. Durante esse exame será avaliados sua frequência cardíaca, pressão arterial e será feito um exame para saber os efeitos da poluição no seu pulmão. Esse exame se chama espirometria. A senhora terá que soprar em um cano (bocal) descartável. Na primeira e na terceira ultrassonografia serão

retirados 10 ml de sangue de sua veia para analisar algumas substâncias que fazem a placenta se desenvolver de forma correta. Caso seja diagnosticado algum problema nos seus exames que precise ser tratado em hospitais, a senhora terá sua consulta agendada no HC ou no HU. Após o nascimento, os crachás deverão permanecer próximos ao bebê, por 15 dias a cada 3 meses, no primeiro ano de vida. A senhora responderá perguntas sobre hábitos de vida, doenças que teve ou tem e sua alimentação. O bebê será acompanhado normalmente na Unidade Básica de Saúde. Durante visitas em sua casa ou, se preferir, durante consultas de rotina serão feitas perguntas sobre a saúde e alimentação do bebê, e medidas de peso e comprimento. Durante o primeiro ano de vida, caso a criança tenha problema respiratório que necessite avaliação médica, como chiado no peito, tosse e febre ou falta de ar, deve procurar o Hospital Universitário onde será atendida e realizará exame da secreção nasal para pesquisar vírus. Este exame é feito rotineiramente no HU nestes casos. Os resultados desta pesquisa serão utilizados para orientar a senhora e sua família sobre as melhores formas para diminuir os efeitos da poluição sobre a saúde e como prevenir infecções respiratórias. Os membros de sua família que forem fumantes e desejarem abandonar este hábito poderão ser matriculados no grupo anti-tabágico do HU.

Garantimos a sua liberdade de não assinar ou retirar este consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo mesmo após o seu início, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu atendimento e de seu filho na UBS ou no HU. As informações serão analisadas em conjunto com outros pacientes. Não será divulgada a identificação do paciente. A senhora será mantida atualizada sobre os resultados da pesquisa. Não há despesas

adicionais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Nos comprometemos a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

O principal investigador, neste estudo, é a Dra Sandra E. Vieira que pode ser encontrada no HU-USP - Av. Lineu Prestes 2565 – Telefone: 3091 9404. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com: Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappespq@hcnet.usp.br, ou Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde - R. Gal. Jardim,36-1andar-V.Buarque- fone 33972464-email: smscep@gmail.com.

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito do que li ou foi lido para mim, sobre a pesquisa: "Impacto das exposições à poluição atmosférica durante a vida intra-uterina e pós natal sobre a saúde respiratória da criança". Discuti com a Dra Sandra Vieira ou com seu substituto, participante da pesquisa, sobre minha decisão em participar do estudo. Ficaram claros para mim os propósitos do estudo, os procedimentos, desconfortos e riscos, garantias de sigilo, de esclarecimentos permanentes e isenção de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo

_____ / / _____

Assinatura do paciente/representante legal

_____ / /

Assinatura da testemunha

(Para casos de pais menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos
ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento
Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação
neste estudo

_____ / /

Assinatura do responsável pelo estudo

Referências

9 - REFERÊNCIAS

1. Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2010;121(21):2331-78.
2. Olmo NR, Saldiva PH, Braga AL, Lin CA, Santos UeP, Pereira LA. A review of low-level air pollution and adverse effects on human health: implications for epidemiological studies and public policy. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(4):681-90.
3. Mirowsky J, Gordon T. Noninvasive effects measurements for air pollution human studies: methods, analysis, and implications. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2015.
4. de Oliveira BF, Chacra AP, Frauches TS, Vallochi A, Hacon S. A curated review of recent literature of biomarkers used for assessing air pollution exposures and effects in humans. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2014;17(7-8):369-410.
5. Costa S, Ferreira J, Silveira C, Costa C, Lopes D, Relvas H, et al. Integrating health on air quality assessment--review report on health risks of two major European outdoor air pollutants: PM and NO₂. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2014;17(6):307-40.
6. Cançado JE, Braga A, Pereira LA, Arbex MA, Saldiva PH, Santos UeP. [Clinical repercussions of exposure to atmospheric pollution]. *J Bras Pneumol*. 2006;32 Suppl 2:S5-11.
7. Rios J, Boechat J. Poluição intra e extradomiciliar. Universidade Federal do Rio de Janeiro: *Rev Bras Alerg Imunopatol*. 2011.
8. Esposito S, Tenconi R, Lelii M, Preti V, Nazzari E, Consolo S, et al. Possible molecular mechanisms linking air pollution and asthma in children. *BMC Pulm Med*. 2014;14:31.
9. CETESB CADEDSP. Qualidade do ar no estado de São Paulo. . 2014.
10. Mayhew TM. A stereological perspective on placental morphology in normal and complicated pregnancies. *J Anat*. 2009;215(1):77-90.
11. André CDSd, André PAd, Rocha FM, Saldiva PHN, Oliveira RCd, Singer JM. Reliability of reflectance measures in passive filters. *Atmospheric Environment*. 2014;92:178-81.
12. Umoh VA, Peters E. The relationship between lung function and indoor air pollution among rural women in the Niger Delta region of Nigeria. *Lung India*. 2014;31(2):110-5.
13. CETESB CADEDSP. Qualidade do ar no estado de São Paulo. . 2013.
14. Chow JC, Engelbrecht JP, Watson JG, Wilson WE, Frank NH, Zhu T. Designing monitoring networks to represent outdoor human exposure. *Chemosphere*. 2002;49(9):961-78.
15. Carneiro MFH, Ribeiro FQ, Fernandes-Filho FN, Lobo DJA, Barbosa Jr. F, Rhoden CR, et al. Pollen abortion rates, nitrogen dioxide by passive diffusive tubes and bioaccumulation in tree barks are effective in the characterization of air pollution. *Environmental and Experimental Botany*. 2011;72:272-7.

16. Sapkota A, Chelikowsky AP, Nachman KE, Cohen AJ, Ritz B. Exposure to particulate matter and adverse birth outcomes: a comprehensive review and meta-analysis. *Air Quality Atmosphere and Health*. 2012;5(4):369-81.
17. Pereira LA, Loomis D, Conceição GM, Braga AL, Arcas RM, Kishi HS, et al. Association between air pollution and intrauterine mortality in São Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect*. 1998;106(6):325-9.
18. Stieb DM, Chen L, Eshoul M, Judek S. Ambient air pollution, birth weight and preterm birth: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Research*. 2012;117:100-11.
19. Romão R, Pereira LA, Saldiva PH, Pinheiro PM, Braga AL, Martins LC. The relationship between low birth weight and exposure to inhalable particulate matter. *Cad Saude Publica*. 2013;29(6):1101-8.
20. Pedersen M, Stayner L, Slama R, Sørensen M, Figueras F, Nieuwenhuijsen MJ, et al. Ambient air pollution and pregnancy-induced hypertensive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Hypertension*. 2014;64(3):494-500.
21. van den Hooven EH, de Kluizenaar Y, Pierik FH, Hofman A, van Ratingen SW, Zandveld PY, et al. Air pollution, blood pressure, and the risk of hypertensive complications during pregnancy: the generation R study. *Hypertension*. 2011;57(3):406-12.
22. Olsson D, Mogren I, Forsberg B. Air pollution exposure in early pregnancy and adverse pregnancy outcomes: a register-based cohort study. *BMJ Open*. 2013;3(2).
23. Yorifuji T, Naruse H, Kashima S, Murakoshi T, Doi H. Residential proximity to major roads and obstetrical complications. *Sci Total Environ*. 2015;508:188-92.
24. Shah PS, Balkhair T, births KSGoDoPL. Air pollution and birth outcomes: a systematic review. *Environ Int*. 2011;37(2):498-516.
25. Kannan S, Misra DP, Dvonch JT, Krishnakumar A. Exposures to airborne particulate matter and adverse perinatal outcomes: a biologically plausible mechanistic framework for exploring potential effect modification by nutrition. *Environ Health Perspect*. 2006;114(11):1636-42.
26. van den Hooven EH, Pierik FH, de Kluizenaar Y, Hofman A, van Ratingen SW, Zandveld PY, et al. Air pollution exposure and markers of placental growth and function: the generation R study. *Environ Health Perspect*. 2012;120(12):1753-9.
27. Dejmek J, Selevan SG, Benes I, Solanský I, Srám RJ. Fetal growth and maternal exposure to particulate matter during pregnancy. *Environ Health Perspect*. 1999;107(6):475-80.
28. Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Maciel Ribeiro AA, Mayhew TM, Saldiva PH, et al. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. *Biol Reprod*. 2008;79(3):578-84.
29. de Melo JO, Soto SF, Katayama IA, Wenceslau CF, Pires AG, Veras MM, et al. Inhalation of fine particulate matter during pregnancy increased IL-4 cytokine levels in the fetal portion of the placenta. *Toxicol Lett*. 2015;232(2):475-80.
30. Janssen BG, Godderis L, Pieters N, Poels K, Kiciński M, Cuypers A, et al. Placental DNA hypomethylation in association with particulate air pollution in early life. *Part Fibre Toxicol*. 2013;10:22.
31. Campbell S. Placental vasculature as visualized by 3D power Doppler angiography and 3D color Doppler imaging. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2007;30(6):917-20.

32. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod.* 2003;69(1):1-7.
33. Guimarães Filho HA, da Costa LL, Araújo Júnior E, Nardozza LM, Nowak PM, Moron AF, et al. Placenta: angiogenesis and vascular assessment through three-dimensional power Doppler ultrasonography. *Arch Gynecol Obstet.* 2008;277(3):195-200.
34. Chaddha V, Viero S, Huppertz B, Kingdom J. Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2004;9(5):357-69.
35. Hata T, Tanaka H, Noguchi J, Hata K. Three-dimensional ultrasound evaluation of the placenta. *Placenta.* 2011;32(2):105-15.
36. Grannum PA, Berkowitz RL, Hobbins JC. The ultrasonic changes in the maturing placenta and their relation to fetal pulmonic maturity. *Am J Obstet Gynecol.* 1979;133(8):915-22.
37. Baba K, Satoh K, Sakamoto S, Okai T, Ishii S. Development of an ultrasonic system for three-dimensional reconstruction of the fetus. *J Perinat Med.* 1989;17(1):19-24.
38. Steiner H, Staudach A, Spitzer D, Schaffer H. Three-dimensional ultrasound in obstetrics and gynaecology: technique, possibilities and limitations. *Hum Reprod.* 1994;9(9):1773-8.
39. Riccabona M, Nelson TR, Pretorius DH, Davidson TE. Distance and volume measurement using three-dimensional ultrasonography. *J Ultrasound Med.* 1995;14(12):881-6.
40. Pairleitner H, Steiner H, Hasenoehrl G, Staudach A. Three-dimensional power Doppler sonography: imaging and quantifying blood flow and vascularization. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1999;14(2):139-43.
41. de Paula CF, Ruano R, Campos JA, Zugaib M. Quantitative analysis of placental vasculature by three-dimensional power Doppler ultrasonography in normal pregnancies from 12 to 40 weeks of gestation. *Placenta.* 2009;30(2):142-8.
42. Araujo Júnior E, Nardozza LM, Nowak PM, Rolo LC, Guimarães Filho HA, Moron AF. Three-dimensional power Doppler placental vascularisation indices in early pregnancy: a pilot study. *J Obstet Gynaecol.* 2011;31(4):283-5.
43. Pomorski M, Zimmer M, Fuchs T, Florjanski J, Pomorska M, Tomialowicz M, et al. Quantitative assessment of placental vasculature and placental volume in normal pregnancies with the use of 3D Power Doppler. *Adv Med Sci.* 2014;59(1):23-7.
44. Mercé LT, Barco MJ, Bau S. Reproducibility of the study of placental vascularization by three-dimensional power Doppler. *J Perinat Med.* 2004;32(3):228-33.
45. de Paula CF, Ruano R, Campos JA, Zugaib M. Placental volumes measured by 3-dimensional ultrasonography in normal pregnancies from 12 to 40 weeks' gestation. *J Ultrasound Med.* 2008;27(11):1583-90.
46. Huster KM, Haas K, Schoenborn J, McVean D, Odibo AO. Reproducibility of placental volume and vasculature indices obtained by 3-dimensional power Doppler sonography. *J Ultrasound Med.* 2010;29(6):911-6.
47. Tuuli MG, Houser M, Odibo L, Huster K, Macones GA, Odibo AO. Validation of Placental Vascular Sonobiopsy for Obtaining Representative Placental Vascular Indices by Three-Dimensional Power Doppler Ultrasonography. *Placenta.* 2010;31(3):192-6.

48. Morel O, Grangé G, Fresson J, Schaaps JP, Foidart JM, Cabrol D, et al. Vascularization of the placenta and the sub-placental myometrium: feasibility and reproducibility of a three-dimensional power Doppler ultrasound quantification technique. A pilot study. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011;24(2):284-90.
49. Odibo AO, Goetzinger KR, Huster KM, Christiansen JK, Odibo L, Tuuli MG. Placental volume and vascular flow assessed by 3D power Doppler and adverse pregnancy outcomes. *Placenta*. 2011;32(3):230-4.
50. Hafner E, Philipp T, Schuchter K, Dillinger-Paller B, Philipp K, Bauer P. Second-trimester measurements of placental volume by three-dimensional ultrasound to predict small-for-gestational-age infants. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 1998;12(2):97-102.
51. Hafner E, Metzenbauer M, Stümpflen I, Waldhör T, Philipp K. First trimester placental and myometrial blood perfusion measured by 3D power Doppler in normal and unfavourable outcome pregnancies. *Placenta*. 2010;31(9):756-63.
52. Metzenbauer M, Hafner E, Hoefinger D, Schuchter K, Philipp K. Associations between birth weight and placental volume in the first trimester. *Zeitschrift Fur Geburtshilfe Und Neonatologie*. 2002;206(4):138-41.
53. Dar P, Gebb J, Reimers L, Bernstein PS, Chazotte C, Merkatz IR. First-trimester 3-dimensional power Doppler of the uteroplacental circulation space: a potential screening method for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;203(3):238.e1-7.
54. de Almeida Pimenta EJ, Silva de Paula CF, Duarte Bonini Campos JA, Fox KA, Francisco R, Ruano R, et al. Three-dimensional sonographic assessment of placental volume and vascularization in pregnancies complicated by hypertensive disorders. *J Ultrasound Med*. 2014;33(3):483-91.
55. Hashish N, Hassan A, El-Semary A, Gohar R, Youssef MA. Could 3D placental volume and perfusion indices measured at 11-14 weeks predict occurrence of preeclampsia in high-risk pregnant women? *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014:1-5.
56. Pomorski M, Zimmer M, Florjanski J, Michniewicz J, Wiatrowski A, Fuchs T, et al. Comparative analysis of placental vasculature and placental volume in normal and IUGR pregnancies with the use of three-dimensional Power Doppler. *Arch Gynecol Obstet*. 2012;285(2):331-7.
57. Steinle S, Reis S, Sabel CE. Quantifying human exposure to air pollution--moving from static monitoring to spatio-temporally resolved personal exposure assessment. *Sci Total Environ*. 2013;443:184-93.
58. SADLER TW. Membranas Fetais e Placenta. In: CORYELL P, editor. *Langman Embriologia Médica*. Sétima edição ed: Guanabara Koogan; 1997. p. 65-76.
59. Nowak PM, Nardoza LMM, Araujo Júnior E, Rolo LC, Guimarães Filho HA, Moron AF. Avaliação do volume da placenta no primeiro trimestre de gestação por meio da ultrassonografia tridimensional utilizando o método XI VOCAL. *Radiologia Brasileira*. 2010;43(2):81-4.
60. Slama R, Darrow L, Parker J, Woodruff TJ, Strickland M, Nieuwenhuijsen M, et al. Meeting report: atmospheric pollution and human reproduction. *Environ Health Perspect*. 2008;116(6):791-8.
61. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*. 1997;277(5332):1669-72.

62. Demir R, Seval Y, Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochem.* 2007;109(4):257-65.
63. Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta.* 2004;25(2-3):114-26.
64. Y. W, S. Z. *Vascular Biology of the Placenta.* San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.
65. Schlembach D, Wallner W, Sengenberger R, Stiegler E, Mörtl M, Beckmann MW, et al. Angiogenic growth factor levels in maternal and fetal blood: correlation with Doppler ultrasound parameters in pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;29(4):407-13.
66. Hafner E, Metzenbauer M, Dillinger-Paller B, Hoefinger D, Schuchter K, Sommer-Wagner H, et al. Correlation of first trimester placental volume and second trimester uterine artery Doppler flow. *Placenta.* 2001;22(8-9):729-34.
67. Nowak PM, Nardoza LMM, Araujo E, Rolo LC, Moron AF. Comparison of placental volume in early pregnancy using multiplanar and VOCAL methods. *Placenta.* 2008;29(3):241-5.
68. Nowak PM, Nardoza LM, Araujo Júnior E, Rolo LC, Moron AF. Comparison of placental volume in early pregnancy using multiplanar and VOCAL methods. *Placenta.* 2008;29(3):241-5.
69. Zalud I, Shaha S. Placental and spiral artery volume and gray-scale value assessment via 3-dimensional sonography in the second trimester. *J Clin Ultrasound.* 2007;35(9):504-8.
70. Moran. 3D Power Doppler ultrasound and computerised placental assessment in normal pregnancy 2014 [Available from: <http://www.myendnoteweb.com/EndNoteWeb.html?func=downloadInstallers&>.
71. Morel O, Pachy F, Chavatte-Palmer P, Bonneau M, Gayat E, Laigre P, et al. Correlation between uteroplacental three-dimensional power Doppler indices and true uterine blood flow: evaluation in a pregnant sheep model. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010;36(5):635-40.
72. Bernardes LS, Francisco RP, Saada J, Salomon R, Ruano R, Lortad-Jacob S, et al. Quantitative analysis of renal vascularization in fetuses with urinary tract obstruction by three-dimensional power-Doppler. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;205(6):572.e1-7.
73. Ruano R, Takashi E, da Silva MM, Campos JA, Tannuri U, Zugaib M. Prediction and probability of neonatal outcome in isolated congenital diaphragmatic hernia using multiple ultrasound parameters. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012;39(1):42-9.
74. Yu CH, Chang CH, Ko HC, Chen WC, Chang FM. Assessment of placental fractional moving blood volume using quantitative three-dimensional power Doppler ultrasound. *Ultrasound in Medicine and Biology.* 2003;29(1):19-23.
75. Merce LT, Barco MJ, Bau S, Kupesic S, Kurjak A. Assessment of placental vascularization by three-dimensional power Doppler "vascular biopsy" in normal pregnancies. *Croat Med J.* 2005;46(5):765-71.
76. Zalud I, Shaha S. Evaluation of the utero-placental circulation by three-dimensional Doppler ultrasound in the second trimester of normal pregnancy. *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.* 2007;20(4):299-305.
77. Guiot C, Gaglioti P, Oberto M, Piccoli E, Rosato R, Todros T. Is three-dimensional power Doppler ultrasound useful in the assessment of placental perfusion in normal and growth-restricted pregnancies? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008;31(2):171-6.

78. Noguchi J, Hata K, Tanaka H, Hata T. Placental vascular sonobiopsy using three-dimensional power Doppler ultrasound in normal and growth restricted fetuses. *Placenta*. 2009;30(5):391-7.
79. Lai PK, Wang YA, Welsh AW. Reproducibility of regional placental vascularity/perfusion measurement using 3D power Doppler. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2010;36(2):202-9.
80. Negrini R, de Silva Bussamra LC, da Silva Valladão de Freitas L, Araujo Júnior E, Piatto S, Nardoza LM, et al. Assessment of placental blood flow between 22 and 34 weeks of gestation by 3D-sonography power Doppler vascular indices. *Arch Gynecol Obstet*. 2011;284(1):53-7.
81. Raine-Fenning NJ, Clewes JS, Kendall NR, Bunkheila AK, Campbell BK, Johnson IR. The interobserver reliability and validity of volume calculation from three-dimensional ultrasound datasets in the in vitro setting. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2003;21(3):283-91.
82. Deurloo K, Spreeuwenberg M, Rekoert-Hollander M, van Vugt J. Reproducibility of 3-dimensional sonographic measurements of fetal and placental volume at gestational ages of 11-18 weeks. *Journal of Clinical Ultrasound*. 2007;35(3):125-32.
83. Jones NW, Raine-Fenning NJ, Mousa HA, Bradley E, Bugg GJ. EVALUATING THE INTRA- AND INTEROBSERVER RELIABILITY OF THREE-DIMENSIONAL ULTRASOUND AND POWER DOPPLER ANGIOGRAPHY (3D-PDA) FOR ASSESSMENT OF PLACENTAL VOLUME AND VASCULARITY IN THE SECOND TRIMESTER OF PREGNANCY. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2011;37(3):376-85.
84. Raine-Fenning NJ, Nordin NM, Ramnarine KV, Campbell BK, Clewes JS, Perkins A, et al. Evaluation of the effect of machine settings on quantitative three-dimensional power Doppler angiography: an in-vitro flow phantom experiment. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008;32(4):551-9.
85. Martins WP, Raine-Fenning NJ, Ferriani RA, Nastri CO. Quantitative three-dimensional power Doppler angiography: a flow-free phantom experiment to evaluate the relationship between color gain, depth and signal artifact. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2010;35(3):361-8.
86. Schulten-Wijman MJ, Struijk PC, Brezinka C, De Jong N, Steegers EA. Evaluation of volume vascularization index and flow index: a phantom study. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008;32(4):560-4.
87. Duan J, Chabot-lecoanet AC, Perdriolle-Galet E, Morel O. QUANTIFICATION OF THE UTERO-PLACENTAL VASCULARISATION WITH THE 3D DOPPLER: IMPACT OF THE MACHINE SETTINGS. *Placenta*. 2014;35(9):A55-A6.
88. Raine-Fenning NJ, Nordin NM, Ramnarine KV, Campbell BK, Clewes JS, Perkins A, et al. Determining the relationship between three-dimensional power Doppler data and true blood flow characteristics: an in-vitro flow phantom experiment. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008;32(4):540-50.
89. Odeh M, Ophir E, Maximovsky O, Grinin V, Bornstein J. Placental volume and three-dimensional power Doppler analysis in prediction of pre-eclampsia and small for gestational age between Week 11 and 13 weeks and 6 days of gestation. *Prenat Diagn*. 2011;31(4):367-71.
90. Arakaki T, Hasegawa J, Nakamura M, Hamada S, Muramoto M, Takita H, et al. Prediction of early- and late-onset pregnancy-induced hypertension using placental volume on three-dimensional ultrasound and uterine artery Doppler. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015;45(5):539-43.

91. Novaes P, do Nascimento Saldiva PH, Matsuda M, Macchione M, Rangel MP, Kara-Jose N, et al. The effects of chronic exposure to traffic derived air pollution on the ocular surface. *Environmental Research*. 2010;110(4):372-4.
92. Vieira SE, Stein RT, Ferraro AA, Pastro LD, Cosme Pedro SS, Lemos M, et al. Urban Air Pollutants are Significant Risk Factors for Asthma and Pneumonia in Children: The Influence of Location on the Measurement of Pollutants. *Archivos De Bronconeumologia*. 2012;48(11):389-95.
93. Hadlock FP. Sonographic estimation of fetal age and weight. *Radiol Clin North Am*. 1990;28(1):39-50.
94. Khatib N, Weiner Z, Beloosesky R, Vitner D, Thaler I. The effect of maternal supine position on umbilical and cerebral blood flow indices. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014;175:112-4.
95. Conceição GM, Miraglia SG, Kishi HS, Saldiva PH, Singer JM. Air pollution and child mortality: a time-series study in São Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect*. 2001;109 Suppl 3:347-50.
96. da Silva AS, Cardoso MR, Meliefste K, Brunekreef B. Use of passive diffusion sampling method for defining NO₂ concentrations gradient in São Paulo, Brazil. *Environ Health*. 2006;5:19.
97. Novaes P, do Nascimento Saldiva PH, Kara-José N, Macchione M, Matsuda M, Racca L, et al. Ambient levels of air pollution induce goblet-cell hyperplasia in human conjunctival epithelium. *Environ Health Perspect*. 2007;115(12):1753-6.
98. Ritz B, Qiu J, Lee PC, Lurmann F, Penfold B, Erin Weiss R, et al. Prenatal air pollution exposure and ultrasound measures of fetal growth in Los Angeles, California. *Environ Res*. 2014;130:7-13.
99. Sørensen M, Daneshvar B, Hansen M, Dragsted LO, Hertel O, Knudsen L, et al. Personal PM_{2.5} exposure and markers of oxidative stress in blood. *Environ Health Perspect*. 2003;111(2):161-6.
100. Jones NW, Hutchinson ES, Brownbill P, Crocker IP, Eccles D, Bugg GJ, et al. In vitro dual perfusion of human placental lobules as a flow phantom to investigate the relationship between fetoplacental flow and quantitative 3D power doppler angiography. *Placenta*. 2009;30(2):130-5.
101. Zalud I, Shaha S. Three-dimensional sonography of the placental and uterine spiral vasculature: Influence of maternal age and parity. *Journal of Clinical Ultrasound*. 2008;36(7):391-6.
102. Rizzo G, Capponi A, Pietrolucci ME, Arduini D. Effects of maternal cigarette smoking on placental volume and vascularization measured by 3-dimensional power Doppler ultrasonography at 11+0 to 13+6 weeks of gestation. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;200(4):415.e1-5.
103. Canfield MA, Ramadhani TA, Langlois PH, Waller DK. Residential mobility patterns and exposure misclassification in epidemiologic studies of birth defects. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2006;16(6):538-43.
104. Pedersen M, Giorgis-Allemand L, Bernard C, Aguilera I, Andersen AM, Ballester F, et al. Ambient air pollution and low birthweight: a European cohort study (ESCAPE). *Lancet Respir Med*. 2013;1(9):695-704.