RAFAELA ALKMIN DA COSTA

Dosagem seriada dos fatores reguladores de angiogênese *soluble fms-like tyrosine kinase-1* (sFlt-1) e *placental growth factor* (PlGF) para predição de pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientadora: Profa. Dra. Rossana
Pulcineli Vieira Francisco
Coorientadora: Mara Sandra Hoshida

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Rafaela Alkmin da

Dosagem seriada dos fatores reguladores de angiogênese *soluble fms-like tyrosine kinase-1* (sFlt-1) e *placental growth factor* (PlGF) para predição de pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada / Rafaela Alkmin da Costa. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientadora: Rossana Pulcineli Vieira Francisco

Coorientadora: Mara Sandra Hoshida

Descritores: 1.Proteínas angiogênicas 2.Fatores de crescimento do endotélio vascular 3.Receptor 1 de fatores de crescimento do endotélio vascular 4.Pré-eclâmpsia

USP/FM/DBD-327/14

Dedico esta tese a Hamilton, meu marido,
pelo incentivo, pelo amor, pelo apoio
incondicional e por doar a mim o melhor
de si, todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Desde muito cedo na trajetória deste trabalho estive ansiosa por escrever este elemento e, mesmo antes do trabalho finalizado, esboçava como seriam minhas palavras de agradecimento.

Em grande parte porque se trata da concretização de uma etapa que considero de imensa importância na carreira que idealizo e, por isso, me traz extrema gratificação; daí a vontade de dividir, ou melhor, de multiplicar esses agradecimentos. Mas também porque tive a felicidade de encontrar em meu caminho pessoas que muito me ajudaram e que fizeram dessa estrada um agradável passeio.

Antes de tudo, quero agradecer a Deus por tamanha generosidade e tantas bênçãos que Tem depositado em mim, por sempre Estar ao meu lado e iluminar os meus passos.

Como não poderia deixar de ser, agradeço aos meus pais, Rosana e Mauro, alicerce de tudo. Porque sempre foram exemplos de luta e de dedicação. Porque, mesmo antes de terem tido oportunidade de cursar o ensino superior, priorizaram a educação em nossas vidas (minha e de minhas irmãs), inculcando em nós o valor do estudo e da escola. Todas as conquistas dessa vida (e provavelmente a dos meus filhos e netos também) serão reflexos dos esforços que depositaram em mim. Obrigada!

Também a eles agradeço por dois presentes de inestimável valor: Carolina e Gabriela, irmãs queridas, amigas fiéis, companheiras de toda hora! Estão presentes em todas as minhas lembranças e nunca, por nenhum segundo, duvidei que estariam ao meu lado. Amo muito vocês, minhas irmãs.

Tive ainda a grande sorte de ter presença constante de meus avós durante minha infância, e agradeço pelo carinho e pelo exemplo de vida, humilde e batalhadora.

Agradeço ao meu marido, Hamilton, que pacientemente me apoiou na decisão deste trabalho e desta carreira, com palavras de incentivos, com gestos de carinho, além dos inúmeros chás e cafés nas noites de vigília dedicadas à finalização deste manuscrito... Sem falar na tolerância dos dias de mau-humor e de tensão... Difícil expressar o quanto sou feliz por ter você ao meu lado, todos os dias.

À nova família, consagrada pelo casamento, agradeço a Reiko, Gaspar, Alexandre e Aline, pelo apoio e pela presença constantes.

Aos amigos queridos e valorosos que cultivamos no dia-a-dia, que fazem os dias mais leves, as piadas mais engraçadas, as lágrimas menos penosas, os obstáculos mais fáceis e os plantões mais divertidos! Obrigada por estarem sempre ao meu lado e por toda a ajuda, seja para questões do trabalho ou da vida pessoal! Eveline, dupla-gêmea desde o primeiro dia da residência, Tatiana, fiel companheira das longas e divertidas jornadas de HC, Cristiane, doce e dedicada, Fernanda, alegre e serena, Rodrigo, “parceiro diabético”, e tantos mais amigos que fazem parte do meu segundo lar! Obrigada!

Ao Prof. Dr. Marcelo Zugaib, que abriu as portas da Clínica Obstétrica desde o primeiro dia em que pus os pés aqui, no terceiro ano da faculdade... E lá se vão dez anos em que frequento esses corredores e sinto-me sempre bem-vinda! Obrigada pelas oportunidades e pela confiança depositada em meu trabalho!

À Profa. Dra. Rossana, minha orientadora, minha amiga, meu exemplo. Nesses dez anos de Clínica Obstétrica sempre estive ali, para ensinar, para guiar, para incentivar... Obrigada pelo carinho de sempre, pelos conselhos sábios, pela presença constante e, principalmente, pela inspiração!

À Mara, minha coorientadora, pelo suporte para a parte laboratorial do projeto, por me fazer ver “o outro lado” da pesquisa: a bancada! Que

tantas vezes impõe obstáculos e desafios, que demanda paciência e otimismo, mesmo quando parece que nada dá certo... perseverar e acreditar!

Ao Prof. Dr. Nilo Bozzini, pelas experiências que dividimos, por sempre ter estado ao meu lado, por ter também me incentivado a seguir carreira acadêmica, quando tantos nos estimulam a desviar dela.

Às colaboradoras indispensáveis deste trabalho, que não aparecem em sua autoria, mas sem as quais sua realização seria impossível: Isis, Salet, Evangelina, Josefa, Graça, Carmo e Ana Maria. Vocês foram imprescindíveis para a coleta e preparo do material desta tese. Obrigada por sempre terem me tratado com tanto carinho e respeito. Pela ajuda incondicional e, tantas vezes, imotivada... simplesmente porque estavam ali e queriam ajudar! Vocês são muito especiais e agradeço a colaboração para este trabalho e para o trabalho do dia-a-dia.

À Dra. Eliane Alves e ao Prof. Dr. Soubhi Kahhale, que pacientemente conviveram com minha presença constante em seus ambulatórios, recrutando pacientes, convocando-as para coletas de sangue e, muitas vezes, aceitando meus pedidos de ajuste nas datas de retornos, mesmo em dias de agenda cheia, para que a programação das coletas não fosse prejudicada. A vocês, meu sincero muito obrigada!

Aos colegas e professores da Clínica Obstétrica, muito obrigada pelo convívio tão precioso, por tudo que me ensinaram, que me ensinam e que certamente continuarão me ensinando a cada dia que tenho a honra de aproveitar suas companhias. É inestimável o quanto se aprende neste lugar, nas conversas de corredor, nas discussões de casos, nas opiniões experientes. É o que faz a Clínica Obstétrica ser um centro de referência, do qual muito me orgulha fazer parte!

A todos os funcionários da Clínica: administrativo, informática, arquivo médico, equipe de enfermagem, equipe do LIM, essa grande família que apoia

e fortalece nosso serviço! À Adriana, secretária da pós-graduação, que faz mais fácil a vida de todo aluno!

Um agradecimento especial aos queridos avaliadores e suplentes da banca de qualificação, Prof. Dr. Adolfo, Dra. Karen, Dr. Silvio, Dra. Lisandra e Dra. Maria Rita, que pacientemente avaliaram esse trabalho e contribuíram de forma valiosíssima para sua melhoria. Foi um grande prazer e um grande aprendizado tê-los nesse momento.

Aos caros avaliadores e suplentes desta banca de hoje, que cuidadosamente avaliaram este manuscrito, que dispensaram seu tempo e sua atenção para, certamente, aprimorar esta tese e contribuir para meu crescimento e amadurecimento acadêmico agora, nos últimos momentos desta etapa.

Obrigada também aos queridos residentes, não só pela disposição em ajudar neste trabalho, mas também pela ajuda nos ambulatórios, nos plantões e pela troca recíproca e contínua de conhecimento. Que a satisfação em vivenciar a vontade de aprender e o crescimento de vocês seja sempre combustível a me mover nessa carreira.

E, finalmente, àquelas que foram essenciais para este e para todos os projetos de pesquisa, nossas preciosas gestantes. Que se puseram generosa e incondicionalmente à disposição para este trabalho. Que batalham suas duplas e triplas jornadas, que vêm de longe para acompanhar o pré-natal neste serviço, muitas vezes em condições as mais adversas possíveis... pelo sonho de darem à luz seus filhos tão desejados. E que, mesmo enfrentando desafios, cansaços, medos e angústias, ainda assim, doam de si para que possamos estudar, aprender e crescer. Meu sincero agradecimento e minha admiração a vocês, sem as quais nada disso faria sentido.

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

Ricardo Reis

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*.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1	<i>Fatores angiogênicos e a fisiopatogenia da pré-eclâmpsia</i>	<i>11</i>
2.2	<i>PIGF e sFlt-1 como fatores associados ao diagnóstico de pré-eclâmpsia</i>	<i>13</i>
2.3	<i>PIGF e sFlt-1 como ferramentas para predição de pré-eclâmpsia</i>	<i>20</i>
2.4	<i>PIGF e sFlt-1 nas gestações de alto risco para pré-eclâmpsia.....</i>	<i>23</i>
2.5	<i>PIGF e sFlt-1 nas gestações com hipertensão arterial crônica.....</i>	<i>27</i>
3	JUSTIFICATIVA	32
4	OBJETIVOS	34
5	CASUÍSTICA E MÉTODO	36
5.1	<i>Casuística.....</i>	<i>36</i>
5.2	<i>Cálculo do tamanho amostral</i>	<i>37</i>
5.3	<i>Método</i>	<i>38</i>
5.4	<i>Análise estatística.....</i>	<i>42</i>
6	RESULTADOS	47
6.1	<i>Caracterização da população</i>	<i>47</i>
6.2	<i>Comportamento dos fatores reguladores de angiogênese ao longo da gestação</i>	<i>52</i>
6.3	<i>Comparações das medidas isoladas dos fatores reguladores de angiogênese e sua aplicação na predição de pré-eclâmpsia</i>	<i>60</i>
6.4	<i>Comparações das variações dos fatores reguladores de angiogênese e sua aplicação na predição de pré-eclâmpsia</i>	<i>67</i>
7	DISCUSSÃO	74
7.1	<i>Casuística e método.....</i>	<i>74</i>

7.2	<i>Comportamento dos fatores reguladores de angiogênese ao longo da gestação</i>	79
7.3	<i>Comparações das medidas isoladas dos fatores reguladores de angiogênese entre os grupos.</i>	82
7.4	<i>Comparações das variações dos fatores reguladores de angiogênese nas gestantes que apresentaram pré-eclâmpsia</i>	87
7.5	<i>Fatores angiogênicos como ferramentas preditoras de pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada</i>	89
8	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Comparação das dosagens consecutivas de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF em gestantes normotensas	55
Figura 2-	Comparação das dosagens consecutivas de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF em gestantes com pré-eclâmpsia.....	56
Figura 3-	Comparação das dosagens consecutivas de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF em gestantes com hipertensão arterial crônica.....	57
Figura 4-	Comparação das dosagens consecutivas de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF em gestantes com pré-eclâmpsia superajuntada.....	58
Figura 5 -	Dosagens do fator sFlt-1 ao longo da gravidez em gestantes normotensas (NT) e com hipertensão arterial crônica (HAC).....	60
Figura 6 -	Dosagens do fator PIGF ao longo da gravidez em gestantes normotensas (NT) e com hipertensão arterial crônica (HAC)	61
Figura 7-	Dosagens da razão sFlt-1/PIGF ao longo da gravidez em gestantes normotensas (NT) e com hipertensão arterial crônica (HAC)	62
Figura 8 -	Dosagens dos fatores sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF em gestantes com diagnóstico de pré-eclâmpsia (PE) e pré-eclâmpsia superajuntada (HAC-PE).....	65
Figura 9 -	Variações proporcionais de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF nos intervalos entre 20-26, 26-32 e 32-36 semanas de gestantes normotensas (NT), com hipertensão arterial crônica (HAC), pré-eclâmpsia (PE) e pré-eclâmpsia superajuntada (HAC-PE)	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e sociodemográficas das gestantes à entrada no estudo, de acordo com diagnóstico de hipertensão arterial crônica no início do pré-natal	47
Tabela 2 - Características clínicas basais e desfechos gestacionais das gestantes que iniciaram o pré-natal com pressão arterial normal, de acordo com o diagnóstico final de pré-eclâmpsia.....	49
Tabela 3 - Características clínicas basais e desfechos gestacionais das gestantes que iniciaram o pré-natal com hipertensão arterial crônica, de acordo com o diagnóstico final de pré-eclâmpsia	51
Tabela 4- Parâmetros indicativos de gravidade da doença nas gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada.....	52
Tabela 5 - Valores de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF nas idades gestacionais de 20, 26, 32 e 36 semanas, de acordo com o diagnóstico final de pré-eclâmpsia em gestantes previamente normotensas.....	53
Tabela 6 - Valores de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF nas idades gestacionais de 20, 26, 32 e 36 semanas, de acordo com o diagnóstico final de pré-eclâmpsia, em gestantes com hipertensão arterial crônica	54
Tabela 7 - Medidas séricas de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF em diferentes momentos da gestação, de acordo com o diagnóstico final de pré-eclâmpsia	63
Tabela 8 - Medidas séricas de sFlt1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF em diferentes momentos da gestação, de acordo com o diagnóstico final de pré-eclâmpsia superajuntada.....	64

Tabela 9- Análise <i>Receiver Operator Characteristics</i> (ROC) para avaliação do desempenho das medidas séricas de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF para diagnóstico de pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada	66
Tabela 10- Valores de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada pela dosagem de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF em diferentes idades gestacionais	67
Tabela 11- Variação percentual nos intervalos entre as medidas seriadas de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF com 20, 26, 32 e 36 semanas, de acordo com o diagnóstico final de pré-eclâmpsia	68
Tabela 12- Variação percentual nos intervalos entre as medidas seriadas de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF com 20, 26, 32 e 36 semanas, de acordo com o diagnóstico de pré-eclâmpsia superajuntada.....	69
Tabela 13- Análise <i>Receiver Operator Characteristics</i> (ROC) para avaliação do desempenho das medidas de variação de PIGF e da razão sFlt-1/PIGF para diagnóstico de pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada	71
Tabela 14- Valores de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada pela variação de PIGF e da razão sFlt-1/PIGF em diferentes idades gestacionais	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
AUC	<i>Area Under Curve</i>
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
DHEG	Doença Hipertensiva Específica da Gestação
DHL	Desidrogenase Láctica
DMG	Diabetes <i>Mellitus</i> Gestacional
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DP	Desvio Padrão
DPP	Descolamento Prematuro de Placenta
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	E outros
G	Grama
H	Hora
HAC	Hipertensão Arterial Crônica
HAC-PE	Pré-eclâmpsia superajuntada
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HELLP	<i>Hemolysis, Elevated Liver Enzymes and Low Platelets Count</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IC	Intervalo de Confiança
IG	Idade Gestacional
IIQ	Intervalo Interquartil
IMC	Índice de Massa Corpórea
KDR	<i>Kinase Domain Receptor</i>
kg	Quilograma
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LIM	Laboratório de Investigação Médica
m	Metro
mg	Miligrama
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mL	Mililitro
mmHg	Milímetros de Mercúrio
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
n	Número
NT	Normotensa(s)
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
PE	Pré-eclâmpsia
pg	Picograma
PIG	Pequeno para a Idade Gestacional
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i>

RCF	Restrição de Crescimento Fetal
ROC	<i>Receiver Operating Characteristics</i>
sFlt-1	<i>soluble fms-like tyrosine kinase-1</i>
SST	<i>Serum Separator Tube</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGO	Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
TTGO75g	Teste de Tolerância à Glicose Oral com 75 gramas
UI	Unidade Internacional
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
<	Menor que
≤	Menor ou igual a
>	Maior que
≥	Maior ou igual a
±	Mais ou menos

RESUMO

COSTA, RA. *Dosagem seriada dos fatores reguladores de angiogênese soluble *fms-like tyrosine kinase-1* (sFlt-1) e placental growth factor (PlGF) para predição de pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Apesar de sua importância clínica e epidemiológica, a fisiopatologia da pré-eclâmpsia ainda não foi completamente compreendida. Sabe-se que a doença constitui-se de uma fase pré-clínica e um estágio clínico. Durante a última década muito esforço tem se concentrado na identificação precoce da doença, ainda em sua fase pré-clínica. A literatura científica tem demonstrado claramente um desequilíbrio na regulação da angiogênese das gestantes com pré-eclâmpsia, marcado por níveis elevados do fator antiangiogênico *soluble fms-like tyrosine kinase-1* (sFlt-1) e níveis diminuídos do fator pró-angiogênico *placental growth factor* (PlGF). Embora um número crescente de estudos em populações de alto risco tenha avaliado o papel desses biomarcadores no diagnóstico de pré-eclâmpsia, dados sobre sua utilização para a predição de pré-eclâmpsia superajuntada, cujo diagnóstico pode ser particularmente difícil, permanecem relativamente escassos e controversos. Com o presente estudo pretendemos avaliar o desempenho de medidas seriadas dos níveis maternos circulantes dos fatores sFlt-1 e PlGF, bem como da razão sFlt-1/PlGF, para predição de pré-eclâmpsia superajuntada e compará-lo ao seu desempenho na predição de pré-eclâmpsia em sua forma “pura”, não superajuntada. Para este propósito, estudamos uma coorte prospectiva composta de dois braços, um de gestantes com hipertensão arterial crônica e outro de gestantes normotensas, e avaliamos os níveis séricos de sFlt-1 e de PlGF e a razão sFlt-1/PlGF nas idades gestacionais de 20, 26, 32 e 36 semanas, tendo como desfecho principal o diagnóstico de pré-eclâmpsia. Um total de 97 gestantes foram acompanhadas, 37 normotensas e 60 com hipertensão arterial crônica. Entre elas, 4 (10,8%) desenvolveram pré-eclâmpsia e 14 (23,3%) desenvolveram pré-eclâmpsia superajuntada. Para predição de pré-eclâmpsia, a análise ROC (*Receiver Operating Characteristics*) apresentou área sob a curva (AUC – *area under curve*) de 0,83 (IC 95% = 0,68-0,99, P = 0,035) para dosagem de PlGF com 20 semanas e AUC = 0,92 (IC 95% = 0,81 - 1,00, P = 0,007) para a razão sFlt-1/PlGF com 26 semanas de gestação. A variação percentual dos níveis de PlGF entre 26 e 32 semanas de gestação apresentou AUC = 0,96 (IC de 95% = 0,89-1,00, P = 0,003). Para a predição de pré-eclâmpsia superajuntada, a razão sFlt-1/PlGF na idade gestacional de 32 semanas apresentou AUC = 0,69 (IC de 95% = 0,53-0,85, P = 0,039). Entre 20 e 26 semanas de gestação, a variação percentual do PlGF e da razão sFlt-1/PlGF apresentaram, respectivamente, AUC = 0,74 (IC de 95% = 0,58-0,90, P = 0,018) e AUC = 0,71 (IC 95% = 0,52-0,91, P = 0,034). Por nossos resultados podemos concluir que, embora os níveis de PlGF e a razão sFlt-1/ PlGF tenham apresentado bons desempenhos na predição de pré-eclâmpsia, é preciso ter cuidado ao usá-los para a predição de pré-eclâmpsia superajuntada. Nessas gestantes, a dosagem dos fatores angiogênicos apresenta capacidade de predição menor e mais tardia. Avaliações seriadas dos fatores podem melhorar o desempenho

dos testes para predição de pré-eclâmpsia superajuntada em idades gestacionais mais precoces.

Descritores: proteínas angiogênicas, fatores de crescimento do endotélio vascular, receptor 1 dos fatores de crescimento do endotélio vascular, pré-eclâmpsia

ABSTRACT

COSTA, RA. *Serial assessment of the angiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) and placental growth factor (PlGF) levels for predicting preeclampsia and superimposed preeclampsia [thesis]*. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

Despite being a major public health problem, the pathophysiology of preeclampsia is incompletely understood. Preeclampsia progression comprises a pre-clinical stage and a clinical stage. During the last decade much work has focused on identifying the pre-clinical stage of preeclampsia. Many researchers have clearly demonstrated an anti-angiogenic imbalance that is marked by higher levels of soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) and lower levels of placental growth factor (PlGF) in the subjects who develop preeclampsia compared with those who do not. Although a growing number of studies in the high-risk population have shown the role of these biomarkers in diagnosing preeclampsia, superimposed preeclampsia, which can be a challenging diagnosis, remains partially understudied and the literature regarding this subject continues to be relatively scarce as well as controversial. By this study, we aimed to evaluate the performance of serial measurements of maternal circulating sFlt-1 and PlGF levels for the prediction of superimposed preeclampsia in chronic hypertensive subjects and to compare it to the prediction of preeclampsia in normotensive control subjects. For this purpose, we evaluated a two-armed prospective cohort of women with normotensive and chronic hypertensive pregnancies and assessed the serum levels of sFlt-1 and PlGF and the sFlt-1/PlGF ratio at gestational ages of 20, 26, 32 and 36 weeks, having preeclampsia as the primary outcome to be predicted. A total of 97 women were followed-up, 37 in the normotensive group and 60 in the chronic hypertensive group. Among them, 4 (10.8%) women developed preeclampsia and 14 (23.3%) developed superimposed preeclampsia. For predicting preeclampsia, PlGF at 20 gestational weeks presented an AUC=0.83 (CI 95% = 0.68 - 0.99, P=0.035) and the sFlt-1/PlGF ratio at 26 gestational weeks presented an AUC=0.92 (CI95% = 0.81 – 1.00, P=0.007). The percent change of the PlGF levels between 26 and 32 gestational weeks presented an AUC=0.96 (CI 95% = 0.89 – 1.00, P=0.003). For predicting superimposed preeclampsia, the sFlt-1/PlGF ratio at 32 gestational weeks presented an AUC=0.69 (CI 95% = 0.53 – 0.85, P=0.039). Between 20 and 26 gestational weeks, the percent change of PlGF and the sFlt-1/PlGF ratio presented, respectively, an AUC=0.74 (CI 95% = 0.58 – 0.90, P=0.018) and an AUC=0.71 (CI 95% = 0.52 – 0.91, P=0.034). By our results, we concluded that, although the PlGF level and the sFlt-1/PlGF ratio present good performances in the prediction of preeclampsia, caution is required when using them for the prediction of superimposed preeclampsia. Sequential assessments slightly improve the test performances for predicting superimposed preeclampsia at earlier gestational ages.

Descriptors: angiogenic proteins, vascular endothelial growth factors, vascular endothelial growth factor receptor-1, pre-eclampsia

1 INTRODUÇÃO

As síndromes hipertensivas sempre despertaram grande interesse em Obstetrícia, tanto por sua alta prevalência na gravidez quanto pela grande morbimortalidade que impõem ao binômio materno-fetal.

De um modo geral, persistem como a principal causa de mortalidade materna no mundo¹⁻³. Dados de 2006 da Organização Mundial de Saúde (OMS) atribuem às síndromes hipertensivas 25,7% dos casos de óbitos maternos na América Latina⁴. Na cidade de São Paulo, esta estatística foi confirmada por Vega, Kahhale e Zugaib (2007), os quais relatam que a hipertensão arterial foi responsável por 23,3% dos casos de morte em gestantes e puérperas e, dentre essas, quase 70% dos casos deveram-se à pré-eclâmpsia⁵. Em dados mais recentes do Ministério da Saúde, referentes ao ano de 2012, as síndromes hipertensivas permanecem importante causa de mortalidade materna, responsáveis por 22,17% dos óbitos no Brasil e 18,06% dos óbitos no Estado de São Paulo⁶.

Em primeiro lugar, há que se classificar as síndromes hipertensivas na gestação, uma vez que as diferentes classes apresentam riscos e evoluções particulares. Basicamente, dividem-se em dois grandes grupos: a hipertensão arterial crônica, que se conceitua pelo aumento dos níveis pressóricos sistêmicos que não se atem ao período gestacional, sendo diagnosticada antes da gestação ou até a 20^a semana de gravidez; e a doença hipertensiva específica da gestação (DHEG) ou pré-eclâmpsia. Como acontece com muitas doenças cuja fisiopatogenia não é bem esclarecida, o conceito de pré-eclâmpsia acaba remetendo às suas manifestações clínicas, em que se pese hipertensão, edema e proteinúria surgidos após a 20^a semana de gestação⁷. Há mais de uma maneira de se classificar as síndromes hipertensivas na gestação e aquela adotada na Clínica Obstétrica resume-se em⁸:

- A) Doença Hipertensiva Específica da Gestação ou Pré-Eclâmpsia
 - a. Pré-Eclâmpsia leve

- b. Pré-Eclâmpsia grave
- c. Eclâmpsia
- B) Hipertensão Arterial Crônica
 - a. Não complicada
 - b. Complicada

Os critérios utilizados para o diagnóstico de pré-eclâmpsia leve e grave resumem-se em:

A) Pré-eclâmpsia leve (presença de dois critérios):

- Pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e/ou diastólica ≥ 90 mmHg após a 20ª semana de gestação
- Proteinúria ≥ 300 mg em volume de 24 h ou edema generalizado (edema de mãos e face ou ganho de ≥ 1 kg em uma semana)

B) Pré-eclâmpsia grave (presença de um dos critérios abaixo em gestantes com diagnóstico de pré-eclâmpsia)

- Pressão arterial sistólica ≥ 160 mmHg e/ou diastólica ≥ 110 mmHg, confirmada em duas medidas com intervalo mínimo de uma hora
- Proteinúria ≥ 5 g em volume de 24 h
- Oligúria (diurese < 400 mL em 24 h)
- Cianose e/ou edema pulmonar
- Iminência de eclâmpsia (cefaleia e epigastralgia e alterações visuais)

A eclâmpsia caracteriza-se pela ocorrência de convulsões tônico-clônicas generalizadas, sem outras causas estabelecidas, em gestante com diagnóstico de pré-eclâmpsia. A hipertensão arterial crônica pode ser considerada complicada quando cursa com insuficiência cardíaca, renal ou quando a ela sobrepõe-se a pré-eclâmpsia, condição também chamada de pré-eclâmpsia superajuntada⁸.

Muitas vezes, no entanto, é difícil se fazer o diagnóstico diferencial entre as síndromes hipertensivas, especialmente nos casos em que o início do pré-natal é tardio e ocorre após a 20ª semana de gestação.

Quanto à prevalência, estima-se que cerca de 5% das gestantes apresentem hipertensão arterial crônica (HAC) durante a gestação, mas a prevalência da doença varia muito de acordo com a população estudada, podendo atingir até 35% das gestantes⁹. Gaio et al. apresentaram, em 2001, estudo de coorte em mulheres brasileiras em que a prevalência de HAC foi de 4%¹⁰.

Dentre as gestantes que apresentam HAC, 15 a 30% poderão desenvolver pré-eclâmpsia superajuntada, forma grave de hipertensão que se caracteriza pela piora do controle pressórico e pelo surgimento de proteinúria previamente ausente, ou pela piora de proteinúria previamente existente após a 20ª semana de gestação^{8,9,11-13}.

A prevalência de pré-eclâmpsia na gestação é ainda mais incerta, uma vez que varia muito com a população estudada e os critérios diagnósticos utilizados. Dados da literatura apontam para valores de 5 a 10%^{8,9,14-16}, mas são descritas cifras que variam de 0,4 a 17,25%^{17,18}. Em publicação da década de 80, a incidência de pré-eclâmpsia na Clínica Obstétrica do HC-FMUSP foi de 13%¹². Alguns grupos de risco podem apresentar incidência ainda maior, como as gestantes obesas, diabéticas, trombofílicas, lúpicas, nefropatas e as portadoras de síndrome antifosfolípide. Nuliparidade, história familiar ou pregressa de pré-eclâmpsia, gestações múltiplas, gestações molares e aloimunização ao fator Rh também constituem fatores de risco para o desenvolvimento da doença^{8,13,19,20}.

Apesar de a HAC aumentar o risco de alguns desfechos adversos na gestação, como restrição de crescimento fetal, prematuridade, descolamento prematuro de placenta, cesáreas e óbito fetal, na maioria das vezes a doença cursa na sua forma não complicada durante a gravidez, sem repercussões desfavoráveis maternas ou fetais⁹.

Por sua vez, a pré-eclâmpsia, seja na forma “pura” ou superajuntada à HAC, determina um aumento de três a 25 vezes no risco de complicações obstétricas^{1,2,19}.

Dentre as complicações maternas, a pré-eclâmpsia pode ser responsável por situações clínicas graves, como insuficiência renal aguda, edema agudo de pulmão, insuficiência hepática, hemorragia cerebral e coagulopatia. Em 4 a 12% dos casos de pré-eclâmpsia grave há evolução para a síndrome HELLP (do acrônimo em inglês: *hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets count*), entidade clínica cuja mortalidade materna chega a 24% e a mortalidade perinatal 30 a 40%⁸.

Como complicações obstétricas, a pré-eclâmpsia está associada a maior risco de restrição de crescimento fetal (RCF), descolamento prematuro de placenta (DPP) e óbito fetal. Uma vez que o único tratamento definitivo conhecido para a pré-eclâmpsia é o parto, a doença também está relacionada a taxas mais altas de prematuridade e suas consequências, como o desconforto respiratório do recém-nascido e a necessidade de internação em unidade de terapia intensiva (UTI) neonatal^{1,8,19}.

Embora o parto seja a única forma de tratamento definitivo, o diagnóstico e a assistência precoces podem mudar ou retardar a progressão da doença ou, ao menos, as consequências de suas complicações. Dados do Reino Unido baseados em revisões de registros de atendimentos dos serviços de saúde apontam que 46% das mortes maternas e 65% das mortes fetais poderiam ter tido manejo diferente do que foi realizado e que, talvez, esse manejo pudesse ter mudado o desfecho da gestação. Isso porque existe, ainda hoje, falha em se identificar os fatores de risco da gestante, bem como em reconhecer precocemente e tomar atitudes diante do diagnóstico de pré-eclâmpsia²¹.

A despeito de sua importância clínica e epidemiológica e dos esforços que tem sido empregados neste sentido, a fisiopatogenia da pré-eclâmpsia ainda não foi elucidada.

A placenta foi proposta como peça central no desenvolvimento da doença em 1939. O conhecimento de que a pré-eclâmpsia poderia desenvolver-se mesmo na ausência de feto, como no caso das gestações molares, associado à percepção de que a retirada da placenta após o parto causava reversão do quadro clínico de pré-eclâmpsia, levou os pesquisadores a concentrarem sua atenção neste órgão. Estudos anatomopatológicos de placentas de mulheres com pré-eclâmpsia evidenciavam múltiplos infartos, estreitamento das artérias e arteríolas, trombose e deposição de fibrina, sugerindo que a vascularização dessas placentas encontrava-se prejudicada. Estudos hemodinâmicos também demonstram que as placentas de gestações com pré-eclâmpsia apresentam, com maior frequência, fluxo diminuído e resistência vascular aumentada, sinais associados a insuficiência placentária¹⁹.

O processo de placentação fisiológica depende da invasão do trofoblasto nas arteríolas espiraladas maternas. Esta invasão promove o remodelamento das arteríolas espiraladas, pela substituição da camada muscular média, transformando-as em vasos de grande capacitância e baixa resistência, processo que se inicia no final do primeiro trimestre e termina por volta de 20 semanas de gestação, conhecido como pseudovasculogênese¹.

A pseudovasculogênese ocorre em meio à mudança da expressão local de diversas citocinas, moléculas de adesão, moléculas da matriz extracelular, metaloproteinases, moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), antígenos leucocitários (HLA), fatores de transcrição e fatores de crescimento, transformando as características do microambiente de epiteliais para endoteliais¹.

Nas mulheres que desenvolvem pré-eclâmpsia, essa invasão trofoblástica ocorre de maneira superficial, sem remodelamento das artérias espiraladas, permanecendo o leito placentário com alta resistência e levando a uma circulação uteroplacentária insuficiente, com isquemia placentária relativa^{1,14,22}.

Diversos mecanismos têm sido postulados para a regulação dessa invasão trofoblástica. Existem evidências de que variações na pressão de oxigênio também possam exercer mecanismo regulatório. Indivíduos com doenças que cursam com predisposição à insuficiência vascular (como diabetes *mellitus*, trombofilias, HAC e lúpus eritematoso sistêmico) apresentam maior incidência de pré-eclâmpsia, talvez em consequência de isquemia placentária relativa e invasão trofoblástica deficiente¹.

Tendo em mente este processo precoce de placentação deficiente, a pré-eclâmpsia é vista, há muito tempo, como doença de dois estágios: pré-clínico e clínico¹².

O estágio pré-clínico corresponde à fase inicial da doença, em que ocorreria, precocemente, estado de isquemia placentária. Os fatores determinantes primários da isquemia permanecem obscuros; teorias envolvem mecanismos genéticos, imunológicos e ambientais^{23,24}. Os fatores angiogênicos, que são expressos por macrófagos, trofoblastos e células da decídua materna, também medeiam a formação capilar dos vilos, e o desbalanço de sua expressão pode estar relacionado a esse estágio precoce da doença. Nesta fase, que cronologicamente corresponde ao primeiro e início do segundo trimestre da gestação, não há expressão fenotípica da doença, sendo impossível identificá-la clinicamente¹⁵.

A placenta responderia ao estado de isquemia com produção e liberação de substâncias capazes de causar disfunção endotelial materna sistêmica, resultando na expressão fenotípica da doença, mais precisamente hipertensão, proteinúria e edema. Esta fase corresponderia ao segundo estágio da pré-eclâmpsia, equivalente à fase clínica da mesma, que se manifesta mais tardiamente no segundo e no terceiro trimestre da gestação¹⁵.

Esses fatores, produzidos pela placenta em decorrência da isquemia trofoblástica, já haviam sido referidos como “endotoxina placentária” em modelo proposto por Kahhale e Zugaib (1995), no qual a liberação desta

“endotoxina” seria responsável pela lesão endotelial sistêmica que caracteriza a pré-eclâmpsia e leva à sua expressão fenotípica²⁵.

Evidências recentes sugerem que, até mais do que isquemia por hipoperfusão, o estreitamento das artérias espiraladas determinaria aumento da velocidade do sangue que chega ao espaço intervilo, que por sua vez geraria dano por hipoperfusão-reperfusão tecidual e lesão por estresse oxidativo. Este mecanismo levaria à liberação placentária de proteínas que atingem a circulação materna e causam a lesão endotelial²⁶.

O endotélio (antigamente negligenciado e considerado apenas como uma camada vascular) seria o órgão fundamental na fisiopatogenia da pré-eclâmpsia. Sabe-se hoje que o endotélio desempenha funções importantes, como a modulação do tônus vascular, os controles da adesão e da agregação plaquetárias, o controle da permeabilidade vascular e a inibição da coagulação. A pré-eclâmpsia seria, então, um estado de desbalanço da função endotelial, em que se pese a perda da refratariedade vascular a agentes vasoativos, vasoconstrição generalizada, aumento da permeabilidade vascular e estado pró-trombótico^{26,27}.

O entendimento do estágio pré-clínico da pré-eclâmpsia é considerado passo fundamental para o estudo de intervenções que possam mudar a história natural da doença.

Reconhecer precocemente ou mesmo antever o desenvolvimento da pré-eclâmpsia é um desejo há muito almejado pelos obstetras. Uma vez que a fisiopatogenia da pré-eclâmpsia não está bem estabelecida e, portanto, a prevenção primária ainda não é possível, a prevenção secundária sobressai como estratégia importante para diminuir a morbimortalidade associada a esta condição.

Com este intuito, desde a década de 70, muitos autores vem se empenhando em estabelecer métodos capazes de identificar o estágio pré-clínico da pré-eclâmpsia.

Nesse sentido, o pioneiro foi Gant, em 1973, ao idealizar o teste da angiotensina II, avaliando a resposta vasotensora à angiotensina no início do terceiro trimestre da gestação; esta mostrou-se progressivamente exacerbada nas mulheres que desenvolviam pré-eclâmpsia, quando comparadas às normais²⁸. Trabalhos que o sucederam, no entanto, apresentaram resultados muito variados o que, aliados à invasividade do teste, fizeram com que caísse em esquecimento^{29,30}.

Também de Gant et al. (1974) é que surgiu outro teste com objetivo de prever a pré-eclâmpsia, o então chamado *roll-over test*. Consistia, basicamente, da constatação do aumento de pelo menos 20 mmHg na pressão arterial diastólica em gestantes com pré-eclâmpsia, quando da mudança do decúbito lateral esquerdo para a posição supina, entre a 28ª e 32ª semanas de gestação³¹. Este teste foi reproduzido na Clínica Obstétrica na década de 80 por Kahhale et al. (1983), que encontraram sensibilidade de 67% e especificidade de 94% para diagnóstico de pré-eclâmpsia²⁹. Quando repetido em gestantes com HAC para avaliação do risco de pré-eclâmpsia superajuntada, no entanto, o desempenho do método foi insatisfatório, com sensibilidade de 29% e especificidade de 19%³².

Desde então muitos autores galgaram por este caminho, em busca de testes que fossem bons preditores de pré-eclâmpsia, quais sejam clínicos (como modelos matemáticos baseados nos fatores de risco para pré-eclâmpsia), físicos (como o uso da dopplervelocimetria de artérias uterinas) ou laboratoriais (como dosagens de ácido úrico, fibronectina, citocinas, DNA fetal)^{26,30,33,34}.

Mais recentemente, autores propõem modelos multifatoriais, incluindo características clínicas e laboratoriais maternas para a predição de pré-eclâmpsia ainda no primeiro trimestre³⁵⁻³⁸.

Entretanto, os dados publicados até o momento não fornecem subsídios suficientes para a utilização destes testes na prática clínica para o rastreamento da pré-eclâmpsia³⁴.

Neste contexto, muitos esforços têm se concentrado na investigação de biomarcadores para a pré-eclâmpsia e, na última década, fatores reguladores da angiogênese têm recebido papel de destaque como marcadores de diagnóstico, predição e prognóstico da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fatores angiogênicos e a fisiopatogenia da pré-eclâmpsia

O êxito da placentação fisiológica depende da regulação dos processos de angiogênese (formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes) e vasculogênese (diferenciação local de precursores de angioblastos em novos vasos sanguíneos), além da pseudovasculogênese, como já mencionada previamente.

Esta regulação se dá por múltiplos fatores, dentre os quais: fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e seus receptores, angiopoetinas, fator de crescimento de fibroblasto e seus receptores, interleucina-6, fator induzido por hipóxia-1-alfa, fator transformador de crescimento β -1 e interleucina-8¹⁵.

O VEGF é expresso em tecidos de diversos órgãos, como coração, rins, cérebro, pulmões e placenta. Na placenta, sua expressão se dá pelo citotrofoblasto e sinciotrofoblasto³⁹.

A família do VEGF desempenha papel de destaque na regulação da angiogênese e inclui os fatores VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D, além do fator de crescimento placentário (PIGF).

O VEGF-A atua como mitógeno específico endotelial, por meio de ligação de alta afinidade com seus receptores, denominados *vascular endothelial growth factor receptor-1* (VEGFR-1) ou *fms-like tyrosine kinase* (Flt-1) e *vascular endothelial growth factor receptor-2* (VEGFR-2) ou *kinase domain receptor* (KDR). Os receptores de VEGF são majoritariamente expressos nas células endoteliais, mas também já foram identificados em células mononucleares do sangue periférico, em células da musculatura lisa de vasos, no tecido adiposo, em células epiteliais da córnea e também no trofoblasto humano⁴⁰⁻⁴⁸. Ambos são importantes para o desenvolvimento vascular

embrionário, mas apresentam intensidades de resposta diferentes ao estímulo por VEGF. O VEGFR-1 exibe resposta muito mais fraca ao estímulo com VEGF, exercendo algum efeito regulatório inibitório da angiogênese ao captá-lo. Além disso, existe uma forma alternativa solúvel de expressão do VEGFR-1, chamada sFlt-1, que não possui a porção transmembrana do receptor e, portanto, não exerce atividade de sinalização intracelular, funcionando como antagonista da atividade angiogênica do VEGF^{1,22}.

Além de estimular a angiogênese, o VEGF induz a produção de óxido nítrico e de prostaciclina vasodilatadoras pelas células endoteliais. Estudos também demonstram que o VEGF está envolvido no reparo de danos celulares nos capilares glomerulares. O VEGF é, portanto, importante não só para a angiogênese, mas também para o controle da vasorreatividade e a manutenção do endotélio sadio, influenciando, inclusive, na formação das fenestras endoteliais^{19,49}.

Os fatores angiogênicos estão relacionados a diversas doenças que cursam com aumento de vascularização, como retinopatia diabética, carcinogênese e artrite reumatoide⁵⁰. Constatou-se, por estudos de outras áreas (em especial de oncologia), que pacientes que recebiam medicamentos antagonistas de VEGF desenvolviam proteinúria e hipertensão¹.

Os primeiros estudos que sugeriram que o desbalanço de fatores angiogênicos e antiangiogênicos pudesse estar envolvido na patogênese da pré-eclâmpsia datam da década de 90. A molécula que protagonizou essas pesquisas foi o próprio VEGF^{27,51}.

Estudos em modelos animais incentivaram as pesquisas dos fatores angiogênicos como agentes importantes no desenvolvimento da pré-eclâmpsia. Murakami et al. (2005) observaram aumento da pressão arterial sistólica e da hipercoagulabilidade em camundongos em que se administrou endovenosamente VEGF recombinante exógeno; evidenciaram, ainda, redução desses sinais após administração intraperitoneal de anticorpos anti-VEGF.

Seu ensaio fortalecia a hipótese de que os fatores angiogênicos, em especial o VEGF, estariam envolvidos na fisiopatogenia da pré-eclâmpsia⁵².

Muitos trabalhos foram realizados nesta década e no início dos anos 2000 com o propósito de comparar as concentrações séricas e/ou plasmáticas de gestantes com pré-eclâmpsia àsquelas de gestantes normais, a fim de se utilizar o VEGF como ferramenta diagnóstica ou prognóstica na gestação. No entanto, muitos deles terminaram em resultados inconclusivos, alguns sugerindo que mulheres com pré-eclâmpsia apresentavam aumento de VEGF^{22,27,51,53,54} e outros sugerindo que a doença promovia diminuição do VEGF^{39,55,56}. A maior limitação destes estudos, com o tempo foi percebido, consistia da dificuldade técnica em se dosar o VEGF. Isso porque a molécula pode apresentar-se sob isoformas diferentes, além das formas livre ou ligada a receptores. Dependendo do método empregado para detecção, poder-se-ia dosar uma forma ou outra, tornando-se difícil a comparação dos resultados entre os grupos. Além disso, em muitos dos trabalhos os níveis de VEGF de grande parte das amostras encontravam-se muito baixos, menores que o limite de detecção dos testes^{22,39,51,56-58}.

Com isso, na última década voltou-se a atenção para outros fatores reguladores da angiogênese, que se mostraram mais constantes em sua avaliação e que poderiam, assim, ser utilizados em estudos de diagnóstico e predição de pré-eclâmpsia. Neste sentido, mostraram-se promissores e ganharam a atenção de diversos grupos de pesquisadores o PlGF e o receptor sFlt-1.

2.2 PlGF e sFlt-1 como fatores associados ao diagnóstico de pré-eclâmpsia

Assim como o VEGF, o PlGF é membro da família dos fatores de crescimento do endotélio vascular. Foi primeiramente identificado na placenta,

sendo produzido pelo citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto, mas hoje sabe-se que pode ser expresso por diversos tipos celulares, como células endoteliais, células da musculatura lisa, fibroblastos, leucócitos, linfócitos, macrófagos, hepatócitos, neurônios, cardiomiócitos e condrócitos⁵⁹. Sua ação ocorre por meio da ligação com os receptores VEGFR-1, mas não com os receptores VEGFR-2. O PIGF atua principalmente como fator pró-angiogênico, capaz de induzir proliferação, migração e ativação das células endoteliais. Ao contrário do VEGF, o PIGF sofre regulação negativa em regime de hipóxia. Tanto o VEGF-A como o PIGF atuam na invasão trofoblástica^{15,39,60}.

Além dos fatores promotores da angiogênese, o contrabalanceamento promovido pela presença de proteínas antiangiogênicas também é fundamental para a regulação adequada da placentação. Dentre os fatores antiangiogênicos, recebe grande importância o sFlt-1. A placenta é a maior fonte de sFlt-1, embora já se tenha detectado mRNA de sFlt-1 nos pulmões, rins, fígado, tecido adiposo e útero^{41,50}. O sFlt-1 sofre regulação positiva em regime de hipóxia⁶¹. A produção de sFlt-1 ocorre fisiologicamente pelo trofoblasto e aumenta com o avanço da idade gestacional, como medida de regulação da placentação. No entanto, o excesso ou a precocidade na produção de sFlt-1 poderiam prejudicar esse processo¹⁵.

O primeiro estudo a associar diminuição dos níveis séricos de PIGF à ocorrência de pré-eclâmpsia foi publicado em 1998 por Torry et al. Partindo de ensaios previamente realizados pelo grupo, em que se constatou que a hipóxia reduzia a expressão de PIGF *in vitro*, os autores hipotetizaram que situações que cursassem com isquemia relativa e hipóxia placentária, como ocorre na pré-eclâmpsia, também pudessem estar relacionadas a uma diminuição na expressão de PIGF. Desta forma, compararam as concentrações séricas de PIGF no momento do parto entre 30 gestantes normais e 30 gestantes com pré-eclâmpsia e observaram valores significativamente menores nas pacientes com pré-eclâmpsia ($132,0 \pm 16,1$ pg/mL vs. $40,7 \pm 3,6$ pg/mL, $P < 0,001$). Estes estudos corroboraram com a hipótese de que a hipóxia resultaria na produção alterada de fatores angiogênicos possivelmente envolvidos na patogênese da pré-eclâmpsia⁶⁰.

O grupo de Livingstom et al. (2000) também foi um dos pioneiros a estudar a associação de níveis séricos de PIGF e a pré-eclâmpsia. Realizou estudo tipo caso-controle em gestantes com pré-eclâmpsia grave (n=21) e gestantes normotensas (n=21), com dosagem sérica de PIGF no momento do parto. Identificou que as pacientes com pré-eclâmpsia apresentavam níveis significativamente mais baixos de PIGF que as gestantes normais (138 ± 119 pg/mL vs. 531 ± 339 pg/mL, $P < 0,001$), apontando, também, que o PIGF poderia estar associado ao diagnóstico da doença⁵⁶.

No Brasil, em 2008, Teixeira et al. apresentaram o primeiro estudo no país sobre associação de PIGF ao diagnóstico de pré-eclâmpsia. Avaliaram a concentração sérica de PIGF, por método ELISA, em 23 gestantes com pré-eclâmpsia e nove gestantes normais, com idade gestacional entre 33 e 35 semanas. Os autores observaram níveis 12 vezes menores de PIGF nas gestantes com pré-eclâmpsia que nas normotensas. Também puderam demonstrar correlação negativa moderada entre os níveis de PIGF e os valores de pressão arterial média ($r = -0,53$), inferindo, novamente, a participação do PIGF na fisiopatologia da pré-eclâmpsia⁶².

Algumas evidências apontavam que o sFlt-1 também estaria envolvido na fisiopatogenia da pré-eclâmpsia. Sabe-se que mulheres primigestas têm risco maior de desenvolverem a doença. Wolf et al. demonstraram, em 2005, que a concentração sérica de sFlt-1 no primeiro trimestre era maior na primeira gestação que na gestação subsequente de mulheres que foram acompanhadas em duas gestações sequenciais, enfatizando que o sFlt-1 poderia estar envolvido no mecanismo da doença⁶³. O tabagismo é conhecido como fator de proteção para pré-eclâmpsia. Foi constatado que gestantes que fumam apresentavam menores valores de sFlt-1 e maiores valores de PIGF que gestantes não fumantes para mesma idade gestacional⁶⁴. Também já foi observado que em gestações com trissomia do cromossomo 13, que carrega os genes para Flt-1 e sFlt-1, é maior a incidência de pré-eclâmpsia⁶⁵.

Makris et al. (2007) elaboraram modelo animal interessante para estudar o papel da isquemia placentária e do sFlt-1 na fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

Por meio de ligadura unilateral da artéria uterina, induziram redução em 30 a 50% da perfusão placentária em babuínos. Esses animais desenvolveram hipertensão, proteinúria e alterações histológicas renais compatíveis com a pré-eclâmpsia em humanos. Os animais apresentaram aumento dos níveis séricos de sFlt-1 em comparação aos valores basais após desenvolvimento da pré-eclâmpsia, mudança não observada no grupo controle (ligadura de pequeno ramo da artéria vesical, grupo em que não houve desenvolvimento de pré-eclâmpsia), além de expressão gênica aumentada de sFlt-1 nas placentas dos animais que sofreram a intervenção⁶⁶.

Alguns grupos nesta época também investigavam longitudinalmente o comportamento dos fatores angiogênicos ao longo de gestações normais^{16,39}.

Os resultados de Torry et al. (1998) indicavam que os níveis séricos de PIGF aumentariam progressivamente durante a gestação normal até o final do segundo trimestre e, por volta da 28^a à 30^a semanas, começariam a diminuir até o termo⁶⁰.

Palm et al. (2011) realizaram coorte prospectiva com gestantes normais para estabelecer o comportamento da curva sérica dos fatores angiogênicos ao longo da gestação nesse grupo. Diferentemente de estudos prévios, foram excluídas gestações que tivessem apresentado qualquer tipo de intercorrência (como parto prematuro, parto pós-data, tabagistas, uso de medicamentos na gestação). Detectaram, para níveis de sFlt-1, valores estáveis até 29-30 semanas, a partir de quando aumentavam até o máximo com 40 semanas. Para as dosagens de PIGF, observaram aumento progressivo até o pico máximo com 29-30 semanas, a partir de quando observaram queda até 40 semanas⁵⁸.

Tendo em vista as associações encontradas entre o diagnóstico de pré-eclâmpsia e dosagens diminuídas de PIGF e aumentadas de sFlt-1, passou-se a estudar também as dosagens simultâneas de PIGF e de sFlt-1 nessas gestantes, bem como a proporção destas medidas, designada pela razão

sFlt-1/PlGF, como forma de se avaliar o desbalanço angiogênico na pré-eclâmpsia^{16,55,57}.

Estudo interessante foi publicado em 2003 por Maynard et al., baseado em modelo humano (incluindo 11 gestantes com pré-eclâmpsia leve, 10 com pré-eclâmpsia grave e 11 normais) e modelo animal (com ratos). Observaram que os níveis séricos de sFlt-1 eram mais altos e os de VEGF e PLGF eram mais baixos nas mulheres com pré-eclâmpsia que naquelas normotensas; além disso, a expressão gênica placentária de RNAm para sFlt-1 encontrava-se aumentada nas pacientes com pré-eclâmpsia. Em cultura celular, obtida a partir do endotélio da veia umbilical das gestantes, observaram que a formação de tubos endoteliais era estimulada quando se acrescentava o soro obtido de mulheres normotensas e que a mesma era inibida quando da exposição ao soro das gestantes com pré-eclâmpsia. Os autores também descreveram, em ratos, que a vasodilatação mediada fisiologicamente por VEGF e PLGF era inibida pela administração exógena de sFlt-1. Também evidenciaram que a administração de sFlt-1 causava nas ratas prenhas aumento da pressão arterial e proteinúria maciça, além de alterações patológicas renais, como o aumento do volume glomerular, com obstrução das alças capilares glomerulares por edema e hipertrofia das células endocapilares (processo chamado endoteliose glomerular, lesão renal típica da pré-eclâmpsia) e deposição de fibrina dentro dos glomérulos, mesmo padrão observado nas gestantes com pré-eclâmpsia. Os resultados encontrados fortaleciam as evidências de que o desbalanço dos fatores reguladores da angiogênese estariam envolvidos na fisiopatogenia da pré-eclâmpsia⁵⁵.

A partir de 2010, com o desenvolvimento de ensaios automatizados para dosagem de sFlt-1 e PlGF, os estudos sobre a aplicabilidade clínica dos fatores angiogênicos ganharam novas possibilidades. A facilidade e a agilidade da medição simplificavam a realização de trabalhos com números muito maiores de gestantes; os limites de detecção mais amplos permitiam a mensuração de uma maior janela de valores, vislumbrando maior aplicabilidade clínica dos testes, uma vez que a análise por ELISA era trabalhosa, demorada e, primariamente, voltada para pesquisa científica^{26,67-71}.

Desta forma, o primeiro estudo a validar o uso de testes automatizados foi publicado em 2010 por Schiettecatte et al., comparando o teste automatizado ao método ELISA utilizado até então nas pesquisas. Os autores obtiveram boa correlação entre os métodos, tanto para sFlt-1 ($r=0.960$) quanto para PIGF ($r=0.968$). Foi avaliado o comportamento dos fatores angiogênicos em 276 amostras de gestantes normais e em 15 amostras de gestantes com pré-eclâmpsia (três delas com síndrome HELLP). Observaram que o comportamento dos fatores angiogênicos em mulheres normais ao longo da gestação foi semelhante àquele previamente descrito pelos ensaios com ELISA. Neste trabalho, as pacientes com pré-eclâmpsia apresentaram níveis mais altos de sFlt-1 e mais baixos de PIGF, quando pareadas por idade gestacional, que as pacientes controle. Avaliando-se a razão sFlt-1/PIGF, as gestantes com pré-eclâmpsia apresentavam valores muito mais altos que os controles ⁶⁷.

No mesmo ano, Sunderji et al. (2010) também publicaram trabalho com ensaio automatizado para investigar o efeito da dosagem de PIGF e sFlt-1 entre 20 e 36 semanas de gestação para o diagnóstico de pré-eclâmpsia. Para isso, realizaram estudo caso-controle, comparando gestantes sem pré-eclâmpsia ($n=409$, sendo que 18 delas tinham o diagnóstico de HAC) e mulheres com sinais e sintomas de pré-eclâmpsia ($n=48$, sendo que nove delas apresentavam pré-eclâmpsia superajuntada). Os autores observaram resultados coerentes com publicações anteriores, com níveis significativamente maiores de sFlt-1 (91.514 vs. 2.416 pg/mL, $P<0,001$) e menores de PIGF (12 vs. 447 pg/mL, $P<0,001$) nas gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia, em comparação às gestantes normotensas. Além disso, puderam constatar que essa diferença nos valores de fatores angiogênicos também era observada comparando-se apenas mulheres com HAC (sFlt-1=59.533 vs. 2.277 pg/mL, $P<0,001$ e PIGF=19 vs. 364 pg/mL, $P<0,001$) àquelas com pré-eclâmpsia superajuntada. Por meio de análise *Receiver Operating Characteristic* (ROC), estimaram a sensibilidade e a especificidade dos testes para o diagnóstico de pré-eclâmpsia, obtendo área sob a curva de 0,98 para sFlt-1 e para PIGF, e de

0,99 para a razão sFlt-1/PIGF, com sensibilidade e especificidade de 96% dos testes para o diagnóstico de pré-eclâmpsia⁶⁸.

Verlohren et al. (2010), realizaram estudo multicêntrico tipo caso-controle incluindo 71 pacientes com pré-eclâmpsia e 280 controles, com avaliação dos níveis de sFlt-1, de PIGF e da razão sFlt-1/PIGF por teste automatizado baseado em eletroquimioluminescência, dosados na primeira consulta após o diagnóstico de pré-eclâmpsia. O estudo possuía também um braço que correspondia a uma coorte prospectiva para dosagem seriada dos fatores angiogênicos nas mulheres normotensas. Os autores incluíram no grupo de pré-eclâmpsia as gestantes com diagnóstico de HAC. Os comportamentos dos marcadores ao longo da gestação normal encontrados pelos autores foram condizentes com aqueles descritos na literatura. Foram observadas diferenças importantes entre os grupos, com valores maiores de sFlt-1 (12.981 ± 965 pg/mL vs. $2.641 \pm 100,5$ pg/mL) e razão sFlt-1/PIGF ($354,5 \pm 44,8$ vs. $19,4 \pm 1,6$) nas pacientes do grupo pré-eclâmpsia que naquelas do grupo controle e valores menores de PIGF ($76,0 \pm 10,7$ pg/ml vs. $341,5 \pm 13,6$ pg/ml) nas pacientes que desenvolveram pré-eclâmpsia. Por meio de curva ROC, obtiveram melhores resultados de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de pré-eclâmpsia pela dosagem da razão sFlt-1/PIGF, com área sob a curva de 0,95 (chegando a 0,97 para os casos de pré-eclâmpsia precoce e 0,89 para casos de pré-eclâmpsia tardia, quando os casos foram subdivididos pela gravidade da doença). Desta maneira, os autores sugerem que, para um valor de corte de 85 da razão sFlt-1/PIGF a sensibilidade do teste seria de 82% para o diagnóstico de pré-eclâmpsia (89% para casos precoces e 74% para casos tardios) e a especificidade de 95% (97% para casos precoces e 89% para casos tardios)⁶⁹.

Diversos estudos se seguiram com propostas de pontos de corte para os testes, no intuito de se estimar o risco considerando-se o diagnóstico ou o prognóstico da pré-eclâmpsia, com diferentes modelos propostos por diferentes autores, sem que se ficasse estabelecido um ponto de corte universal, com boa aplicabilidade clínica⁷²⁻⁷⁴.

2.3 PIGF e sFlt-1 como ferramentas para predição de pré-eclâmpsia

Levine et al. publicaram pela primeira vez, em 2004, resultados para avaliação dos fatores angiogênicos na predição de pré-eclâmpsia. Apresentaram estudo caso-controle aninhado de uma coorte de gestantes que haviam participado de ensaio clínico sobre prevenção de pré-eclâmpsia pela administração de cálcio, comparando 120 gestantes com pré-eclâmpsia a 120 gestantes normais. Avaliaram as concentrações de sFlt-1, PIGF e VEGF ao longo da gestação, com coletas seriadas a cada quatro a cinco semanas. Os autores observaram que o nível de sFlt-1 começou a subir mais precocemente nas mulheres que mais tarde desenvolveram a doença. Puderam constatar, ainda, que esse aumento já se pronunciava nove a 11 semanas antes do desenvolvimento clínico da pré-eclâmpsia, tornando-se mais acentuado cinco semanas antes do diagnóstico. Com relação aos níveis de PIGF, observaram padrão de comportamento semelhante às gestantes normais, mas com valores sempre mais baixos que os controles já a partir da 13^a semana de gestação. Os valores de PIGF mostraram-se pronunciadamente diminuídos nove a 11 semanas antes do diagnóstico da pré-eclâmpsia, e mais marcadamente reduzidos cinco semanas antes do desenvolvimento da hipertensão e proteinúria. Este estudo foi importante, pois anunciava a perspectiva de utilização do PIGF e do sFlt-1 não só como fatores envolvidos na patogênese da doença, mas possíveis marcadores preditores da pré-eclâmpsia e/ou de seu prognóstico. Isso porque os autores identificaram, também, que as diferenças observadas nos níveis de PIGF e sFlt-1 eram maiores nos casos de pré-eclâmpsia grave que naquelas com pré-eclâmpsia leve. A partir de então, uma série de estudos surgiu com este propósito, na esperança de se encontrar marcadores bioquímicos que possibilitassem a predição e intervenção precoces na pré-eclâmpsia¹⁴.

Seguindo esta proposta, no mesmo ano, McKeeman et al. (2004) publicaram estudo de coorte envolvendo 400 gestantes, das quais 23 desenvolveram pré-eclâmpsia e, após critérios de exclusão e perdas, 14

gestantes com pré-eclâmpsia foram utilizadas para comparação com 33 gestantes normais, recrutadas da mesma coorte. Os autores realizaram dosagem seriada de VEGF e sFlt-1, com coletas nas idades gestacionais de 12, 20, 30 e 37 semanas e também antes e após o parto. Os autores puderam observar que os níveis séricos de sFlt-1 eram maiores nas gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia que naquelas normais, com diferença estatisticamente significativa na idade gestacional de 30 semanas e no momento do parto ($P=0,012$ e $P< 0,001$, respectivamente), mostrando que, mais tardiamente na gestação, a dosagem de sFlt-1 poderia ser um marcador de pré-eclâmpsia⁵⁰.

Apesar de grande parte dos estudos apontarem maior associação das alterações dos fatores angiogênicos nos casos de pré-eclâmpsia precoce, alguns demonstraram que a pré-eclâmpsia tardia também está associada à diminuição nas concentrações de PlGF e aumento nas concentrações de sFlt-1^{75,76}.

Leaños-Miranda et al. (2012) estudaram a capacidade dos testes para predição de pré-eclâmpsia em mulheres saudáveis e que ainda não apresentavam sinais da doença. Compararam amostras colhidas a cada quatro semanas entre 20^a e 36^a semanas gestacionais de 37 mulheres com pré-eclâmpsia e 29 mulheres que permaneceram normotensas durante a gravidez. Das gestantes que apresentaram pré-eclâmpsia, 14 desenvolveram a doença no termo (>37 semanas), 11 apresentaram pré-eclâmpsia pré-termo (entre 34 e 37 semanas) e 12 apresentaram pré-eclâmpsia precoce (<34 semanas). Foram avaliadas as concentrações de sFlt-1, PlGF e da razão sFlt-1/PlGF, medidos por teste automatizado. Os autores estabeleceram os intervalos interquartis para as gestantes normais e estimaram a razão de chances para desenvolvimento de pré-eclâmpsia quando os valores de sFlt-1 e razão sFlt-1/PlGF estivessem acima do percentil 75 para a idade gestacional e quando os valores de PlGF estivessem abaixo do percentil 25 para a idade gestacional. Puderam observar aumento significativo de risco para pré-eclâmpsia pré-termo pelas medidas de sFlt-1 com 24 e 28 semanas, PlGF com 28, 32 e 36 semanas e da razão sFlt-1/PlGF com 20, 24 e 28 semanas. Quanto

ao risco de desenvolver pré-eclâmpsia no termo, aumentos significativos de risco foram observados para medidas de PIGF com 24, 28 e 32 semanas e da razão sFlt-1/PIGF com 24 semanas. Finalmente, para aumento de risco de pré-eclâmpsia precoce, mostraram-se significativamente diferentes as dosagens de sFlt-1 com 20, 24 e 28 semanas, de PIGF com 20 semanas e da razão sFlt-1/PIGF com 20 e 26 semanas de gestação. Desta forma, concluíram que a dosagem dos marcadores bioquímicos a partir de 20 semanas poderia ser utilizada para identificar risco aumentado para diagnóstico de pré-eclâmpsia⁷¹.

Em contrapartida, no mesmo ano, McElrath et al. (2012) realizaram estudo multicêntrico prospectivo com 2243 mulheres saudáveis, das quais 6,2% desenvolveram pré-eclâmpsia e 6,8% desenvolveram hipertensão sem proteinúria. Com o objetivo de avaliar a acurácia para predição de pré-eclâmpsia, realizaram dosagem por um método mais novo de imunoensaio (com níveis limites de detecção mais baixos e maior janela de leitura) para marcadores bioquímicos a partir da 10^a semana de gestação. Não observaram padrão de associação significativo no primeiro trimestre e constataram que a sensibilidade e a especificidade dos testes aumentavam com a progressão da idade gestacional, com área sob a curva de 0,53, 0,52 e 0,51, respectivamente, para PIGF, sFlt-1 e razão PIGF/sFlt-1 à dosagem de 10 semanas e chegando a 0,72, 0,72 e 0,74, respectivamente, à medida com 35 semanas²⁶.

Ghosh et al. (2013) compararam a capacidade de predição de pré-eclâmpsia precoce (antes de 32 semanas de gestação) pela dosagem de PIGF no primeiro (11^a a 14^a semana de gestação) e segundo (22^a a 24^a semana de gestação) trimestres de gestação em coorte prospectiva de 1206 gestantes de baixo risco, das quais 19 desenvolveram pré-eclâmpsia precoce. Para a medida de primeiro trimestre, os autores observaram AUC= 0,972 (IC 95% 0,947 – 0,988, P<0,001) e para a dosagem no segundo trimestre obtiveram AUC = 0,980 (IC 95% 0,971 – 0,988, P<0,001). Para esta última dosagem, para valores de PIGF menores ou iguais a 144 pg/mL, os autores observaram sensibilidade de 100% e especificidade de 96,3% para o diagnóstico de pré-eclâmpsia precoce e sugerem que a dosagem no segundo trimestre apresenta melhor relação de custo-benefício para a predição da doença⁷⁷.

2.4 PIGF e sFlt-1 nas gestações de alto risco para pré-eclâmpsia

Embora a literatura apresentasse resultados animadores para o diagnóstico e predição da pré-eclâmpsia, a quase totalidade dos artigos publicados focava a atenção em gestantes normotensas e não definiam bem como seria o comportamento desses biomarcadores nas gestações de alto risco, nem sua capacidade de predição de pré-eclâmpsia, o que seria importante uma vez que a prevalência e a gravidade deste diagnóstico são habitualmente maiores nesse grupo de gestantes.

O primeiro estudo a investigar os fatores angiogênicos como preditores de pré-eclâmpsia em gestações de alto risco foi publicado por Simas et al. em 2007. Neste trabalho, os autores acompanharam prospectivamente 94 mulheres com algum fator de risco para pré-eclâmpsia (hipertensão arterial crônica, diabetes, nefropatia, obesidade, síndrome antifosfolípide ou lúpus eritematoso sistêmico). Destas, cinco desenvolveram pré-eclâmpsia precoce e sete desenvolveram pré-eclâmpsia tardia. Os autores puderam observar que entre 22 e 26 semanas de gestação os níveis de sFlt-1 e da razão sFlt-1/PIGF eram maiores nas gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia precoce que no grupo normal ($P=0,009$ e $P<0,001$, respectivamente), sem diferenças entre aquelas que desenvolveram pré-eclâmpsia tardia e as normotensas; na janela entre 27 e 30 semanas, os níveis de sFlt-1 eram maiores apenas naquelas que desenvolveram pré-eclâmpsia precoce ($P<0,001$) e a razão sFlt-1/PIGF era maior tanto nas gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia precoce ($P<0,001$) como naquelas que desenvolveram pré-eclâmpsia tardia ($P=0,02$). Já na janela de medição entre 31 e 35 semanas, todas as medidas mostraram-se significativamente maiores nas gestantes com pré-eclâmpsia precoce ($P<0,001$ para sFlt-1 e $P<0,001$ para razão sFlt-1/PIGF) e naquelas com pré-eclâmpsia tardia ($P=0,01$ para sFlt-1 e $P<0,001$ para razão sFlt-1/PIGF) quando comparadas às gestantes sem pré-eclâmpsia. Além disso, avaliando-se o comportamento dos marcadores ao longo da gestação, os autores também puderam constatar que os aumentos dos níveis de sFlt-1 e da razão

sFlt-1/PIGF foram mais acentuados nas gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia tardia que naquelas sem pré-eclâmpsia ou com pré-eclâmpsia precoce. A queda dos níveis de PIGF, de maneira semelhante, foi mais acentuada nas gestantes que posteriormente desenvolveram pré-eclâmpsia tardia que nos outros dois grupos⁷⁸.

No ano seguinte, em estudo multicêntrico, Sibai et al. (2008) também avaliaram a capacidade de predição de pré-eclâmpsia em gestações de alto risco (grupo composto por gestantes com diagnóstico de HAC e/ou antecedente de pré-eclâmpsia) por meio da dosagem de fatores angiogênicos. Realizaram duas coletas durante a gestação (uma basal, entre 12 e 16 6/7sem e outra de seguimento, entre 24 e 28 semanas) para dosagem de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF em 707 gestantes de risco e avaliaram a associação destes marcadores ao desenvolvimento subsequente de pré-eclâmpsia. Da coorte inicial, 104 gestantes desenvolveram pré-eclâmpsia (14,7%). A partir da transformação logarítmica dos dados, os autores observaram, pela medição basal, associação entre valores mais baixos de PIGF e ocorrência de pré-eclâmpsia antes de 27 semanas, e entre valores mais altos de sFlt-1 e da razão sFlt-1/PIGF com ocorrência de pré-eclâmpsia antes de 27 semanas; pela dosagem de seguimento, após a 26ª semana, observaram associação entre valores mais baixos de PIGF e ocorrência de pré-eclâmpsia antes de 37 semanas e entre valores mais altos de sFlt-1 e da razão sFlt-1/PIGF com ocorrência de pré-eclâmpsia antes de 37 semanas. Os resultados encontrados apresentavam baixas sensibilidades e baixos valores preditivos positivos dos testes, evidenciando limitações para sua aplicação clínica. Apesar de encontrarem sensibilidades moderadas para predição de pré-eclâmpsia antes de 27 semanas, os valores preditivos positivos encontrados foram muito baixos, não ultrapassando 8,1%, evidenciando, também, limitação para sua aplicação na prática clínica para estes grupos de risco⁷⁹.

Em 2010, Dwyer et al. analisaram as diferenças dos fatores angiogênicos em gestantes com pré eclampsia e sem pré-eclâmpsia de acordo com a ausência ou presença de fatores de risco subjacentes, incluindo para este último grupo gestantes com hipertensão arterial crônica, proteinúria

crônica, LES, outras doenças autoimunes, transplante renal, diabetes pregestacional, antecedente de pré-eclâmpsia, trombofilias, gestações múltiplas, antecedente de RCF e antecedente de descolamento prematuro de placenta. Realizaram dosagens seriadas de sFlt-1, endogлина solúvel e PIGF em quatro momentos: antes de 13 semanas, entre 15 e 20 semanas, entre 24 e 28 semanas, entre 30 e 34 semanas e no parto. Em seus resultados, para pacientes de baixo risco, apenas no momento do parto observaram valores estatisticamente mais altos de sFlt-1 e endogлина solúvel nas pacientes que desenvolveram pré-eclâmpsia. Para gestantes de alto risco, os valores de sFlt-1 foram significativamente maiores nas pacientes com pré-eclâmpsia nas janelas de 15-20 semanas, 24-28 semanas e 30-34 semanas; não houve diferença nos valores de endogлина solúvel e os valores de PIGF foram mais baixos nas mulheres com pré-eclâmpsia nas janelas de 24-28 semanas e 30-34 semanas. No momento do parto, a AUC encontrada para dosagem de sFlt-1 para o diagnóstico de pré-eclâmpsia foi de 0,91 para mulheres de baixo risco e 0,64 para mulheres de alto risco. Adicionalmente, avaliando apenas gestantes que tiveram diagnóstico de pré-eclâmpsia, embora não tenham apresentado a significância para comparação, observaram valores mais baixos de sFlt-1 no momento do parto para gestantes de alto risco que para aquelas de baixo risco e valores semelhantes de PIGF entre os grupos⁸⁰.

Em 2011, Shaker et al. também focaram na predição de pré-eclâmpsia em grupos de risco por meio da dosagem de fatores angiogênicos entre 22 e 26 semanas de gestação, associada à realização de dopplervelocimetria das artérias uterinas à mesma época. Para isso, acompanharam prospectivamente 112 gestantes com risco aumentado para pré-eclâmpsia, o que incluía mulheres com diabetes pregestacional, idade menor que 18 anos, LES ou antecedente de pré-eclâmpsia. Todos os casos foram analisados em conjunto, como um mesmo grupo de risco. Destas, 57 não desenvolveram pré-eclâmpsia, 17 desenvolveram pré-eclâmpsia leve e 38 desenvolveram pré-eclâmpsia grave. Todas as gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia apresentaram dopplervelocimetria de artérias uterinas anormal. Os autores observaram valores significativamente maiores de sFlt-1 nas gestantes com

pré-eclâmpsia leve e grave quando comparadas às normais ($4.707,05 \pm 2.134,32$ pg/ml e $5.184,21 \pm 1.652,60$ pg/mL, respectivamente, vs. $101,70 \pm 157,86$ pg/mL) e valores significativamente menores de PIGF nas gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia grave quando comparadas àquelas com pré-eclâmpsia leve e normais ($174,97 \pm 116,48$ pg/mL vs. $260,73 \pm 112,37$ pg/mL e $407,55 \pm 149,82$ pg/ml, respectivamente). Neste grupo de pacientes de alto risco, para ponto de corte de PIGF $\leq 234,56$ pg/mL, encontraram sensibilidade de 81,6% e especificidade de 85,1% na identificação de pacientes que desenvolveriam pré-eclâmpsia e, para ponto de corte de sFlt-1 ≥ 2900 pg/mL, sensibilidade e especificidade de 100% e 81,1%, respectivamente, sugerindo que seriam exames úteis na predição precoce de pré-eclâmpsia neste grupo de alto risco⁸¹.

Em 2013, Teixeira et al. publicaram estudo prospectivo longitudinal em que dosaram sFlt-1, PIGF e razão sFlt-1/PIGF na idade gestacional de $26,8 \pm 1,5$ semanas em 71 gestações de risco (sendo 25 delas gestantes com hipertensão arterial crônica bem controlada ao recrutamento para o estudo e 46 gestantes nulíparas ou com pré-eclâmpsia prévia), das quais 12 desenvolveram pré-eclâmpsia. Os grupos de risco foram analisados em conjunto. Os autores realizaram análise ROC e descreveram que os biomarcadores foram capazes de predizer o surgimento de pré-eclâmpsia com AUC de 0,90 para PIGF ($P < 0,001$), 0,78 para sFlt-1 ($P = 0,003$) e de 0,95 para razão sFlt-1/PIGF ($P < 0,001$)⁸².

Mais recentemente, Simas et al. (2014) também avaliaram prospectivamente 157 mulheres com alto risco para pré-eclâmpsia (incluindo hipertensão arterial crônica, diabetes pregestacional, antecedente de pré-eclâmpsia, obesidade e nuliparidade), realizando coletas seriadas a cada quatro semanas entre 23 e 36 semanas de gestação para dosagem de sFlt-1, PIGF e endogлина solúvel. As gestantes foram divididas de acordo com o desfecho de pré-eclâmpsia e as dosagens dos biomarcadores comparadas entre os grupos para três janelas de idade gestacional: 23-28 semanas, 28-32 semanas e 31-36 semanas. Por análise de regressão logística multivariada, os autores propuseram dois modelos de predição. Um deles incluía a dosagem de

sFlt-1 na segunda janela de coleta, com AUC=0,85, e o outro incluía a dosagem de sFlt-1 na primeira janela e a variação de endogлина solúvel entre a primeira e a segunda janela, com AUC de 0,91⁸³.

Ainda no ano de 2014, Schoofs et al. apontaram para a importância de medidas repetidas da razão sFlt-1/PIGF para predição de pré-eclâmpsia ao avaliarem prospectivamente 150 pacientes com alto risco para a doença (incluindo gestantes com pré-eclâmpsia ou RCF prévia, obesidade, hipertensão arterial crônica, diabetes pregestacional, doença renal crônica, gestações múltiplas e dopplervelocimetria anormal de artérias uterinas), com dosagem automatizada de sFlt-1 e PIGF em sete intervalos de idades gestacionais: 0-14 semanas, 15-19 semanas, 20-23 semanas, 24-28 semanas, 29-33 semanas, 34-36 semanas e 37-42 semanas. Os autores observaram que a razão sFlt-1/PIGF foi maior nas gestações que apresentaram pré-eclâmpsia até quatro semanas antes do diagnóstico clínico, quando comparadas às que não apresentaram pré-eclâmpsia ($106,7 \pm 47,7$ vs. $21,0 \pm 4,1$; $P=0,02$). Os autores também descreveram que as taxas de aumento da razão sFlt-1/PIGF foram maiores nas gestantes que apresentaram pré-eclâmpsia, reforçando que medidas repetidas puderam evidenciar diferenças dinâmicas da razão sFlt-1/PIGF nas mulheres apresentariam a doença⁸⁴.

2.5 PIGF e sFlt-1 nas gestações com hipertensão arterial crônica

Apesar do recente aumento no número de publicações sobre o papel dos fatores reguladores de angiogênese em gestações de alto risco, a grande maioria deles avaliou população heterogênea de risco, incluindo condições distintas. São escassos os trabalhos desenhados para estudar especificamente as gestantes com hipertensão arterial crônica e o desenvolvimento de pré-eclâmpsia superajuntada.

Neste sentido, Powers et al. (2010) permitiram essa avaliação ao analisarem separadamente os resultados de diferentes condições de risco para pré-eclâmpsia em sua população de estudo. Investigaram a dosagem dos fatores angiogênicos em 194 mulheres com diabetes, 313 mulheres com HAC, 234 mulheres com gestação múltipla e 252 mulheres com pré-eclâmpsia prévia, com coleta de sangue em três momentos da gestação: à entrada no estudo (19 ± 4 semanas), entre 24 e 28 semanas e entre 34 e 38 semanas. A dosagem de PIGF e sFlt-1 foi feita por método ELISA. Das gestantes hipertensas, 78 (24,9%) desenvolveram pré-eclâmpsia superajuntada. Especificamente para as mulheres com hipertensão, pela comparação dos valores basais dos fatores angiogênicos, os autores não puderam observar diferença significativa do risco de pré-eclâmpsia superajuntada nas mulheres com aumento de duas vezes dos níveis de sFlt-1 (OR 1,16 [0,83-1,63]) e de PIGF (OR 0.96 [0.71-1.29]). Avaliaram, então, se a variação de cada fator entre a coleta basal e a coleta de seguimento poderia ser útil na predição de pré-eclâmpsia superajuntada. Não foi observada diferença significativa no risco de pré-eclâmpsia superajuntada para cada aumento de 1ng/mL/semana de sFlt-1 (OR 1.62 [0.94-3.02]) e para cada aumento de 10 pg/mL/semana de PIGF (OR 0.98 [0.9-1.04]) entre as dosagens basal e de seguimento. Os autores também compararam transversalmente as dosagens dos fatores em diferentes janelas de idade gestacional (7-15 semanas, 16-20 semanas, 21-25 semanas, 26-30 semanas, 31-35 semanas e acima de 36 semanas) entre gestantes que desenvolveram ou não pré-eclâmpsia. Observaram que os níveis séricos de sFlt-1 eram maiores nas gestantes hipertensas que naquelas que desenvolveram pré-eclâmpsia entre 26-30 semanas de gestação; não observaram diferenças nas dosagens de PIGF entre gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia superajuntada e seus controles em nenhuma janela de medição, exceto quando comparadas as dosagens realizadas seis a nove semanas antes do diagnóstico de pré-eclâmpsia. Os autores questionaram a aplicabilidade da dosagem destes fatores angiogênicos para predição de pré-eclâmpsia superajuntada em mulheres com hipertensão arterial crônica⁸⁵.

Em 2012, Perni et al. estudaram a associação entre fatores angiogênicos e desenvolvimento de pré-eclâmpsia superajuntada em 109 mulheres com HAC por meio de estudo longitudinal. Destas, nove apresentaram pré-eclâmpsia precoce, 28 apresentaram pré-eclâmpsia tardia e 72 não apresentaram pré-eclâmpsia superajuntada (HAC). Encontraram resultados semelhantes aos previamente descritos para pré-eclâmpsia pura em gestantes normotensas, observando valores significativamente mais altos de sFlt-1 com 20 e 28 semanas de gestação nas mulheres com pré-eclâmpsia precoce quando comparadas às com pré-eclâmpsia tardia e com HAC e apenas na idade gestacional de 36 semanas para gestantes com pré-eclâmpsia tardia comparadas às gestantes com HAC. Quanto ao PIGF, observaram valores significativamente menores na idade gestacional de 28 semanas nas mulheres com pré-eclâmpsia precoce comparadas às HAC e nas idades gestacionais de 28 e 36 semanas nas mulheres com pré-eclâmpsia tardia, quando comparadas às HAC. A razão sFlt-1/PIGF também apresentou diferença significativa entre os grupos, sendo maior nas idades gestacionais de 20 e 28 semanas nas mulheres com pré-eclâmpsia precoce que naquelas com pré-eclâmpsia tardia ou HAC; apenas com 36 semanas a razão sFlt-1/PIGF foi maior nas mulheres com pré-eclâmpsia tardia quando comparadas ao grupo HAC. Em contraposição aos resultados de Powers et al. (2010), os autores obtiveram área sob a curva de 0,852 para modelo de predição de pré-eclâmpsia superajuntada, mas este resultado foi obtido após inclusão de outras variáveis no modelo de predição (pressão arterial sistólica, ácido úrico e atividade plasmática de renina, medidos na idade gestacional de 20 semanas), não tendo os autores fornecido, isoladamente, a AUC, sensibilidades e especificidades encontradas para os fatores sFlt-1, PIGF e para a razão sFlt1/PIGF⁸⁶.

Finalmente, no ano seguinte, Maynard et al. (2013) realizaram análise secundária de estudo observacional realizado em dois centros, envolvendo 156 mulheres de alto risco para pré-eclâmpsia (incluindo gestantes nulíparas, com diabetes pregestacional, com hipertensão arterial crônica, gestações múltiplas e mulheres com antecedente de pré-eclâmpsia) e 59 gestantes de baixo risco

para controle. As dosagens de sFlt-1, PIGF e endoglina solúvel foram feitas em três janelas de idade gestacional: 23-27 semanas, 28-31 semanas e 32-35 semanas. Ao dividirem as gestantes de acordo com o grupo de risco, para gestantes com hipertensão arterial crônica, os autores observaram diferença significativa entre os grupos na média geométrica da razão $(sFlt-1+endoglina)/PIGF$ nas três janelas de idades gestacionais ($P<0,001$), sendo maiores os valores nas gestantes que apresentaram pré-eclâmpsia superajuntada ($n=6$) que naquelas que se mantiveram sem pré-eclâmpsia superajuntada ($n=16$)⁸⁷.

3 JUSTIFICATIVA

Apesar do grande número de trabalhos publicados sobre o valor diagnóstico e preditor dos marcadores bioquímicos sFlt-1, PlGF e da razão sFlt-1/PlGF para a pré-eclâmpsia, os estudos sobre esses biomarcadores na predição de pré-eclâmpsia superajuntada ainda são escassos e controversos.

Dentre os estudos que investigam as gestações de alto risco, apenas três separam os grupos de interesse em gestantes com hipertensão arterial crônica e pré-eclâmpsia superajuntada e apresentam resultados controversos entre si; além disso, nenhum apresenta simultaneamente o desempenho destes fatores reguladores de angiogênese para predição de pré-eclâmpsia em gestantes normotensas e para predição de pré-eclâmpsia superajuntada em gestantes com hipertensão arterial crônica e não está bem estabelecido se esses biomarcadores apresentam o mesmo desempenho para as duas condições.

A perspectiva de se poder estimar o risco de a gestante com hipertensão arterial crônica desenvolver pré-eclâmpsia mostra-se particularmente interessante nesse grupo. Sabe-se que até 30% dessas gestantes apresentarão diagnóstico de pré-eclâmpsia superajuntada, muitas vezes em idade gestacional mais precoce que aquelas observadas para a pré-eclâmpsia “pura”. A determinação deste grupo de gestantes destinadas a apresentar pré-eclâmpsia superajuntada poderia ser útil na identificação de uma população-alvo para pesquisa de intervenções terapêuticas ou mesmo para melhorar a assistência pré-natal destas gestantes, seja pelo aumento na frequência de consultas pré-natal, seja pelo pronto encaminhamento para serviço de referência em gestação de alto risco ou simplesmente por antecipar o reconhecimento da doença e otimizar seu tratamento, uma vez que no grupo de gestantes com hipertensão arterial crônica o diagnóstico de pré-eclâmpsia superajuntada pode ser particularmente mais difícil. Assim sendo, a identificação de métodos de predição de risco de pré-eclâmpsia superajuntada mostrar-se-ia de grande relevância na prática clínica.

4 OBJETIVOS

O objetivo primário deste estudo foi avaliar as dosagens seriadas dos níveis séricos de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF, a partir de 20 semanas de gestação, como fatores preditores de pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada.

Como objetivos secundários pretendemos verificar:

1. Como é o comportamento sérico de cada fator (sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF) ao longo da gestação dentro de cada grupo de gestantes (normotensas, hipertensão arterial crônica, pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada).
2. Se há diferença nos níveis séricos dos fatores sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF entre as pacientes normotensas e com hipertensão arterial crônica nas idades gestacionais de 20, 26, 32 e 32 semanas.
3. Se há diferença nos níveis séricos dos fatores sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF entre as pacientes que apresentaram pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada nas idades gestacionais de 20, 26, 32 e 32 semanas.

5 CASUÍSTICA E MÉTODO

Foi realizado estudo observacional longitudinal prospectivo tipo coorte.

5.1 Casuística

Foram acompanhadas prospectivamente gestantes que iniciaram pré-natal na Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) durante o período de maio de 2011 a janeiro de 2014. Gestantes matriculadas nos ambulatórios de hipertensão e de gestação de baixo risco que contemplavam os critérios de inclusão foram convidadas a participar do estudo, após explicação sobre o projeto de pesquisa e mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do hospital sob protocolo de pesquisa número 0273/10. Gestantes com idade menor que 18 anos tiveram seu TCLE assinado também por seu responsável legal.

Os critérios de inclusão adotados foram:

- gestação única.
- início do pré-natal com idade gestacional de até 20 semanas, confirmada por ultrassonografia do primeiro trimestre ou, na ausência desta, confirmada por duas ou mais ultrassonografias concordantes no segundo trimestre.
- ausência de doenças que cursam habitualmente com vasculopatia periférica (exceto hipertensão arterial crônica), tais quais: diabetes mellitus, collagenoses, caridopatias e trombofilias.

Foram considerados critérios de exclusão:

- diagnóstico de malformações congênitas durante o pré-natal ou no período pós-natal.
- perda de seguimento da gestante, caracterizado por:
 - abandono do pré-natal do HC-FMUSP antes do parto ou
 - coleta de menos de duas amostras em diferentes idades gestacionais durante o pré natal.

Constituição dos grupos

Gestantes normotensas e sem uso de anti-hipertensivos no início do pré-natal foram consideradas para seguimento no grupo de gestantes normais.

Gestantes com aumento dos níveis pressóricos (pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg em duas medidas, com a paciente sentada e em intervalo de 4 horas) ou com diagnóstico prévio de hipertensão arterial crônica (HAC) controlada por dieta ou por medicamentos anti-hipertensivos, antes da 20^a semana de gestação, foram consideradas para seguimento no grupo de gestantes hipertensas.

5.2 Cálculo do tamanho amostral

Apesar de numerosos, os trabalhos publicados sobre fatores angiogênicos são heterogêneos e muitos apresentam apenas os valores transformados encontrados, sem apresentar as medidas de tendência central e de dispersão.

Para o cálculo do tamanho amostral da coorte de gestantes normotensas, baseamo-nos nos estudos de Livingston et al. (2000)⁵⁶ e Staff et al. (2005)⁵⁷. Os autores apresentaram, respectivamente, para os fatores PIGF e sFlt-1 tamanhos de efeito de 1,543 e 1,827 quando da comparação dos níveis séricos de gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia. Estimando em nossa população a incidência de pré-eclâmpsia de 13%, com nível de significância de 0,05 e poder de teste de 80%, nosso tamanho de amostra para identificar diferença dos marcadores entre os grupos seria de 36 (para PIGF) e 28 (para sFlt-1) gestantes. Estimando perda de 10% de seguimento, nossa coorte de gestantes normais envolveria 40 mulheres.

Para o cálculo do tamanho amostral da coorte de gestantes com hipertensão arterial crônica, baseamo-nos nos dados de Simas et al. (2007)⁷⁸. De acordo com a autora, o tamanho do efeito encontrado foi de 1,09 para a dosagem de sFlt-1 com 20 semanas e de 0,98 para a dosagem de sFlt-1 a partir de 31 semanas de gestação, para o diagnóstico de pré-eclâmpsia precoce e tardia, respectivamente. Estimando que a incidência de pré-eclâmpsia superajuntada nas hipertensas crônicas seja de 25%, para poder de 80% e significância de 0,05, nossa coorte de gestantes hipertensas envolveria 56 gestantes. Considerando perda de 10%, o cálculo foi de 62 gestantes com hipertensão arterial crônica.

5.3 Método

As gestantes recrutadas para o estudo mantiveram acompanhamento em seu ambulatório de origem, seguindo as rotinas assistenciais da Clínica Obstétrica pelos médicos que as assistiam, os quais não faziam parte da pesquisa.

Destas gestantes foram colhidas, prospectivamente, amostras de sangue nas idades gestacionais pré-determinadas de 20, 26, 32 e 36 semanas para

medição sérica dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos PIGF e sFlt-1 e cálculo da razão sFlt-1/PIGF.

O sangue da paciente foi coletado nos dias de suas consultas de pré-natal ou durante internação na enfermaria da Clínica Obstétrica, por meio de punção venosa periférica, acondicionado em tubo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e prontamente encaminhado ao laboratório da Disciplina de Obstetrícia (Laboratório de Investigação Médica – LIM 57) para processamento. O soro foi separado do sangue total utilizando-se tubo separador de soro (*SST – serum separator tube*), com coagulação da amostra por 30 minutos, seguida de centrifugação por 15 minutos e estocado em temperatura de -80°C para posterior análise.

As análises das amostras foram realizadas em duplicata, no LIM 57, utilizando-se kits comerciais disponíveis para testes imunoenzimáticos (técnica de ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) Quantikine® da R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN), conforme orientações do fabricante.

Os ensaios foram realizados por equipe alheia à condição clínica de cada gestante. As reações para dosagem de PIGF foram feitas com a diluição de 1:3 e as reações para dosagem de sFlt-1 foram feitas com diluição de 1:6, de maneira que os resultados das medições estivessem dentro da faixa mensurável das curvas-padrão de cada kit. Os limites de detecção das amostras são, conforme orientação do fabricante dos kits reagentes, 7 pg/mL para PIGF e 3,5 pg/mL para o sFlt-1.

Simplificadamente, a técnica padronizada pode ser assim descrita: anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de PIGF e sFlt-1 revestem uma placa com 96 poços de análise. Amostras séricas das pacientes em estudo são pipetadas nos poços de análise e a substância em investigação (PIGF ou sFlt-1) liga-se ao seu anticorpo específico. Após lavagem da placa, retiram-se as substâncias não ligadas e um anticorpo policlonal específico para a molécula em questão é adicionado aos poços de análise. Segue-se nova lavagem para remover substâncias não ligadas aos anticorpos e novo substrato reagente é adicionado aos poços para leitura, de maneira a colori-los com

intensidade proporcional à quantidade de moléculas presentes na amostra. A intensidade da cor é medida por espectrofotometria e determina a quantidade de PIGF ou sFlt-1 presente na amostra.

Para cada ensaio uma curva padrão com concentrações conhecidas dos reagentes foi construída e a medida do fator em análise (PIGF ou sFlt-1) calculada com base na regressão polinomial de segundo grau obtida a partir desta curva ($r^2 \geq 0,99$).

As gestantes do estudo foram caracterizadas de acordo com as seguintes informações:

- Idade (anos).
- Cor da pele (branca, parda, preta, amarela), referida pela paciente.
- IMC pregestacional (kg/m^2): medida obtida pela razão $\text{peso}/\text{altura}^2$, sendo este peso referido pela gestante ou aferido durante o primeiro trimestre, quando ela não souber referir.
- Primigesta (sim, não): primeira gestação da mulher.
- Tabagismo (sim, não): uso de cigarro durante a gravidez, referido pela gestante.
- Idade gestacional do início do pré-natal (em semanas): idade gestacional em que a gestante se apresentou para o pré-natal em nosso ambulatório.
- História de pré-eclâmpsia em gestações prévias (sim, não): referida pela gestante.
- Presença de outras doenças não associadas a vasculopatia periférica no início do pré-natal (sim, não).

Foi considerado desfecho principal da gestação a ocorrência de pré-eclâmpsia, de acordo com a seguinte classificação de síndromes hipertensivas na gestação, adotada na Clínica Obstétrica do HC-FMUSP:

A) *Gestantes com pré-eclâmpsia (PE)* – gestantes normotensas que apresentaram, após a 20ª semana de gravidez: aumento dos

níveis pressóricos (pressão arterial sistólica $\geq 140\text{mmHg}$ e/ou pressão arterial diastólica $\geq 90\text{mmHg}$ em duas medidas, com a paciente sentada) E edema generalizado (considerado generalizado o edema de mãos e face e/ou ganho de peso ≥ 1000 gramas/semana) E/OU proteinúria $\geq 300\text{mg/volume}$ em urina de 24 horas (ou $\geq 1\text{g/L}$ em amostra de urina isolada).

B) Gestantes com pré-eclâmpsia superajuntada (HAC-PE) - gestantes com diagnóstico de HAC que desenvolveram, após a 20ª semana de gestação: aumento dos níveis pressóricos e surgimento de proteinúria previamente inexistente ($\geq 300\text{mg/volume}$ em urina de 24h ou 1g em amostra de urina isolada) ou piora de proteinúria previamente presente.

De acordo com a ocorrência do desfecho principal, os grupos foram comparados quanto aos seguintes resultados obstétricos e parâmetros laboratoriais:

- Idade gestacional do diagnóstico de pré-eclâmpsia (semanas), naquelas com diagnóstico de PE.
- PE precoce (sim não): diagnóstico de PE antes de 34 semanas de gestação, naquelas com diagnóstico de PE.
- Idade gestacional do parto (semanas).
- Via de parto (normal, fórceps, cesárea).
- Sexo do recém-nascido (masculino, feminino).
- Peso do recém-nascido (gramas).
- Recém nascido pequeno para a idade gestacional (sim, não): quando o peso do recém-nascido for menor que o percentil 10 para a idade gestacional, conforme a curva de Alexander.
- Peso da placenta (gramas).
- Diagnóstico de diabetes gestacional durante a gravidez (sim, não), definida pela presença de pelo menos um dos critérios: glicemia de jejum do início do pré-natal $\geq 92\text{mg/dL}$, glicemia de jejum do teste de tolerância à glicose oral de 75g (TTGO75g) $\geq 92\text{mg/dL}$, medida após 1 hora da sobrecarga do TTGO75g $\geq$

180mg/dL, medida após 2 horas de sobrecarga do TTGO75g $\geq$ 153mg/dL⁸⁸.

- Alteração da vitalidade fetal anteparto (sim, não): ocorrência de alterações das provas de vitalidade fetal (perfil biofísico e/ou hemodinâmico fetal) antes do início do trabalho de parto.
- Diagnóstico de síndrome HELLP (sim, não): presença de alterações laboratoriais, a saber: TGO > 70UI/L, TGP > 70UI/L, DHL > 600UI/L, bilirrubina total > 1,2mg%, plaquetas < 100.000/mm³, naquelas com diagnóstico de PE.
- Diagnóstico de eclâmpsia ou iminência de eclâmpsia (sim, não): ocorrência da tríade de cefaleia e epigastralgia e alterações visuais (iminência de eclâmpsia) e/ou de convulsões (eclâmpsia), naquelas com diagnóstico de PE.
- Níveis séricos de sFlt-1 (pg/mL): medida sérica de sFlt-1, obtida nas idades gestacionais de 20, 26, 32 e 36 semanas
- Níveis séricos de PIGF (pg/mL): medida sérica de PIGF, obtida nas idades gestacionais de 20, 26, 32 e 36 semanas
- Níveis séricos da razão sFlt-1/PIGF: medida da razão dos fatores sFlt-1 e PIGF, obtida nas idades gestacionais de 20, 26, 32 e 36 semanas

5.4 Análise estatística

Para a análise estatística foram usados os softwares Microsoft Excel versão 2007 para construção do banco de dados e IBM SPSS Statistics for Macintosh 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY) para cálculos estatísticos.

Os dados qualitativos foram descritos utilizando-se medidas de frequência absoluta e relativa (percentual).

Os dados quantitativos foram apresentados em forma de medidas de tendência central e de dispersão (média, mediana, desvio-padrão e intervalo interquartil). Não foram realizadas transformações nem tratamento dos dados para análise.

Para efeito de comparação, as gestantes foram divididas durante as análises de acordo com a situação inicial de entrada no estudo (normotensas e hipertensas) e, então, quanto à ocorrência ou não do desfecho pré-eclâmpsia (PE e HAC-PE, respectivamente). Para possibilitar melhor comparação de nossos resultados com aqueles publicados na literatura, foram excluídas das análises estatísticas as gestantes com diagnóstico de pré-eclâmpsia cujo resultado de proteinúria foi negativo.

Os dados qualitativos foram comparados por meio de teste Qui-quadrado, teste exato de Fisher ou Razão de Verossimilhança, quando adequado.

Para testar normalidade dos dados quantitativos foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Dados com distribuição normal tiveram suas médias comparadas por meio de teste t-Student ou ANOVA, conforme indicado. Os dados não paramétricos foram comparados quanto aos valores de suas medianas utilizando-se teste de Mann-Whitney U para análises bivariadas e teste de Kruskal-Wallis ou teste de Friedman para análises multivariadas. Nesta última situação, para avaliação post-hoc foram realizados testes de Wilcoxon entre pares, aplicando-se a correção de Bonferroni quando adequado.

Foi adotado nível de significância de 0,05 para interpretação dos resultados.

Para a análise dos resultados:

1. Comparamos as medidas repetidas de um mesmo marcador para cada gestante em momentos distintos da gestação, para avaliarmos o comportamento dos marcadores bioquímicos durante a gestação em cada grupo. Para esta análise foram

incluídas apenas as gestantes de quem foram obtidas todas as quatro amostras nas idades gestacionais programadas.

2. Os marcadores bioquímicos sFlt-1 e PIGF e a razão sFlt-1/PIGF foram comparados entre os grupos em cada idade gestacional (20, 26, 32 e 36 semanas de gestação); para esta avaliação foram incluídas todas as amostras colhidas de todas as gestantes.

Por esta avaliação foram estudados os efeitos entre as dosagens séricas de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF em cada idade gestacional e o diagnóstico de PE ou HAC-PE.

3. Realizamos análise *Receiver Operating Characteristics* (ROC) para os fatores e idades gestacionais que se mostraram significativamente diferentes entre os grupos de interesse.

Identificamos ponto de maior sensibilidade e especificidade destes marcadores em cada idade gestacional para o diagnóstico de PE e HAC-PE.

4. Avaliamos a evolução dinâmica dos fatores reguladores de angiogênese estimando a variação percentual de cada fator nos diferentes intervalos de medição para cada grupo de gestantes. O primeiro intervalo corresponde ao período entre a 20^a e 26^a semana, o segundo intervalo entre a 26^a e 32^a semana e o terceiro intervalo entre 32^a e 36^a semana de gestação. As variações percentuais foram comparadas entre os grupos e obtidas usando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Variação percentual no intervalo} = \left[\frac{\text{dosagem momento 2} - \text{dosagem momento 1}}{\text{dosagem momento 1}} \right] \times 100$$

Por esta análise estimamos os efeitos entre as variações percentuais observadas em cada intervalo de medição de cada fator e o diagnóstico de PE ou HAC-PE.

Para representação gráfica dessa variação, para cada intervalo foi admitido como valor unitário (1,00) a dosagem da medida mais precoce e, a partir desta, a dosagem subsequente foi representada pela soma ou subtração da variação percentual encontrada em cada intervalo para cada grupo. Por exemplo, se em um grupo de gestantes foi observado aumento de 25% da dosagem do fator entre a primeira e a segunda dosagem, naquele intervalo a primeira dosagem foi representada por “1,00” e a segunda dosagem foi representada por “1,25”.

5. Realizamos análise *Receiver Operating Characteristics* (ROC) para as variações dos fatores que se mostraram significativamente diferentes entre os grupos de interesse.

Identificamos ponto de melhor sensibilidade e especificidade destas variações estimadas para cada intervalo de medição para o diagnóstico de PE e HAC-PE.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização da população

Durante o período de estudo foram recrutadas 102 gestantes, sendo 40 normotensas e 62 hipertensas. Das pacientes inicialmente envolvidas na pesquisa, foram excluídas por abandono do pré-natal ou falha no seguimento das coletas três mulheres do grupo de normotensas e duas do grupo de hipertensas, permanecendo, portanto, para avaliação 97 gestantes (37 normotensas e 60 hipertensas).

Na Tabela 1 estão apresentadas as características sociodemográficas das gestantes à entrada no estudo.

Tabela 1 - Características clínicas e sociodemográficas das gestantes à entrada no estudo, de acordo com diagnóstico de hipertensão arterial crônica no início do pré-natal – HC-FMUSP - São Paulo, 2011-2014

	Normotensas (N=37)	Hipertensas (N=60)	
	Média ± DP n (%)	Média ± DP n (%)	P
Idade (anos)*	29,07 ± 5,85	34,41 ± 6,49	<0,001 ⁵
Cor			0,058 ⁶
Branca	26 (70,3%)	29 (48,3%)	
Parda	8 (21,6%)	16 (26,7%)	
Preta	3 (8,1%)	15 (25,0%)	
IMC¹ prégestacional (kg/m²)*	26,15 ± 4,89	29,84 ± 5,51	0,001 ⁵
Primigesta	14 (37,8%)	13 (21,7%)	0,084 ⁶
Tabagismo	4(10,8%)	3 (5,0%)	0,422 ⁷
IG² início do pré-natal (semanas)*	12,27 ± 3,16	14,35 ± 3,31	0,003 ⁸
Outras doenças³	4 (10,8%)	9 (15,0%)	0,761 ⁷
PE⁴ prévia	3 (8,1%)	16 (26,7%)	0,025 ⁶

1- IMC= Índice de massa corporal; 2- IG = idade gestacional; 3- Outras doenças apresentadas: anemia, hipotireoidismo, hipertireoidismo, asma, ansiedade, depressão, epilepsia, sífilis e miomas; 4- PE= pré-eclâmpsia; 5 – teste Mann-Whitney; 6- teste Qui-quadrado; 7- teste exato de Fisher; 8- teste t-Student; * indicam P<0,05

Verificamos que as gestantes com diagnóstico de HAC no início do pré-natal tinham idade maior que as normotensas ($P < 0,001$) e eram mais frequentemente de cor preta, embora a diferença de cor entre os grupos não tenha alcançado significância estatística ($P = 0,058$). Observamos também que as gestantes com HAC apresentavam maior IMC ($P = 0,001$) e começaram o pré-natal mais tardiamente ($P = 0,003$). Apesar de observarmos maior frequência de primigestas no grupo de gestantes normotensas, essa diferença não se mostrou estatisticamente significativa ($P = 0,084$). As gestantes com HAC tinham mais frequentemente antecedente de PE que as normotensas ($P = 0,025$).

Outras doenças apresentadas pelas gestantes ao início do pré-natal foram: dois casos de anemia, três casos de hipotireoidismo, um caso de hipertireoidismo, dois casos de asma leve, um caso de transtorno de ansiedade, um caso de depressão, um caso de epilepsia, um caso de sífilis e um caso de miomatose uterina, não havendo diferença entre os grupos com relação à prevalência destas outras condições.

Da coorte de 37 gestantes normotensas, oito (21,6%) apresentaram diagnóstico de PE durante a gestação, sendo quatro (10,8%) com proteinúria positiva e quatro (10,8%) com proteinúria negativa. Dentre as 60 gestantes com HAC, 14 (23,3%) foram diagnosticadas com HAC-PE. Os casos de PE com proteinúria negativa foram excluídos para as comparações entre grupos.

Foram incluídas para análise, portanto, 93 gestantes que contribuíram com 342 amostras de sangue, coletadas nas idades gestacionais de 20,00 ($\pm 0,91$), 26,22 ($\pm 1,06$), 31,98 ($\pm 0,89$) e 36,02 ($\pm 0,71$) semanas.

As características clínicas basais maternas e os desfechos gestacionais das mulheres que iniciaram o pré-natal normotensas estão descritos na Tabela 2 e comparados de acordo com o diagnóstico final de PE. Observamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação a idade, cor, IMC pregestacional, primiparidade, tabagismo, idade gestacional de início do pré-natal, antecedente de PE ou presença de outras doenças.

Quanto aos desfechos gestacionais, as mulheres que fizeram diagnóstico de PE apresentaram maior incidência de alteração de vitalidade fetal anteparto ($P=0,033$), parto em idade gestacional mais precoce ($P=0,025$) e menor peso do recém-nascido ($P=0,008$) que as gestantes normais (NT).

Tabela 2 - Características clínicas basais e desfechos gestacionais das gestantes que iniciaram o pré-natal com pressão arterial normal, de acordo com o diagnóstico final de pré-eclâmpsia - HC-FMUSP - São Paulo, 2011-2014

	NT (n=29)	PE (n=4)	P
	Média ± DP n (%)	Média ± DP n (%)	
Idade (anos)	29,68 ± 6,07	26,41 ± 6,17	0,322 ⁶
Cor			0,173 ¹⁰
Branca	18 (62,1%)	4 (100%)	
Parda	8 (27,6%)	0 (0%)	
Preta	3 (10,3%)	0 (0%)	
IMC¹ pregestacional (kg/m²)	25,11 ± 3,70	29,32 ± 6,53	0,289 ⁶
Primigesta	10 (34,5%)	3 (75%)	0,276 ⁷
Tabagismo	4 (13,8%)	0 (0%)	1,000 ⁷
IG² de início do pré-natal (semanas)	12,02 ± 3,05	13,61 ± 3,91	0,351 ⁶
Outras doenças³	3 (10,3%)	1 (25,0%)	0,420 ⁷
PE prévia	1 (3,4%)	1 (25,0%)	0,231 ⁷
IG² parto (semanas)*	38,70 ± 3,03	36,75 ± 2,05	0,025 ⁸
Via de parto			0,487 ⁹
Normal	7 (24,1%)	1 (25,0%)	
Fórcipe	5 (17,2%)	0 (0%)	
Cesárea	17 (58,6%)	3 (75,0%)	
Recém-nascido sexo masculino	16 (55,2%)	2 (50,0%)	1,000 ⁷
Peso recém-nascido (gramas)*	3177 ± 584	2343 ± 810	0,008 ⁸
Recém-nascido PIG⁴	3 (10,34%)	2 (50,0%)	0,099 ⁷
Peso placenta (gramas)	427 ± 87	371 ± 148	0,295 ⁶
Diagnóstico de DMG⁵	6 (20,7%)	2 (50,0%)	0,241 ⁷
Alteração de vitalidade fetal anteparto*	1 (3,45%)	2 (50,0%)	0,033 ⁷

NT= normotensas; PE = pré-eclâmpsia; 1- IMC= Índice de massa corporal; 2- IG= idade gestacional; 3- Outras doenças apresentadas: anemia, depressão, hipotireoidismo; 4- PIG = pequeno para a idade gestacional; 5- DMG= diabetes mellitus gestacional; 6= teste t-Student; 7= teste exato de Fisher; 8= teste de Mann-Whitney; 9= Razão de Verossimilhança. * $P < 0,05$

Para as gestantes que iniciaram o pré-natal com diagnóstico de hipertensão arterial crônica, as características foram comparáveis entre os grupos, havendo diferença significativa entre eles apenas para a idade gestacional de início de pré-natal, que foi maior naquelas com diagnóstico final de HAC ($P=0,045$), conforme apontado na Tabela 3.

Quanto aos desfechos gestacionais, constatamos naquelas que desenvolveram HAC-PE partos em idades gestacionais mais precoces ($P<0,001$), menor peso de nascimento dos recém-nascidos ($P<0,001$) e das placentas ($P=0,014$), assim como maior incidência de recém-nascidos pequenos para a idade gestacional ($P=0,006$), quando comparadas àquelas com HAC apenas.

As alterações de vitalidade fetal anteparto encontradas e que indicaram a resolução da gestação foram:

- Gestantes NT: um caso de desaceleração tardia em idade gestacional de 38 5/7 semanas.
- Gestantes com PE: um caso de diástole zero na idade gestacional de 33 6/7 semanas e um caso de oligoâmnio na idade gestacional de 36 6/7 semanas.
- Gestantes com HAC: um caso de mecônio anteparto em idade gestacional de 38 2/7 semanas, dois casos de oligoâmnio nas idades gestacionais de 37 4/7 semanas e de 39 semanas.
- Gestantes com HAC-PE: um caso de oligoâmnio com idade gestacional de 33 semanas.

Tabela 3 - Características clínicas basais e desfechos gestacionais das gestantes que iniciaram o pré-natal com hipertensão arterial crônica, de acordo com o diagnóstico final de pré-eclâmpsia - HC-FMUSP - São Paulo, 2011-2014

	HAC (n=46)	HAC-PE (n=14)	
	Média ± DP n (%)	Média ± DP n (%)	P
Idade (anos)	33,97 ± 6,61	35,85 ± 6,09	0,518 ⁷
Cor			0,891 ⁸
Branca	23 (50,0%)	6 (42,9%)	
Parda	12 (26,1%)	4 (28,6%)	
Preta	11 (23,9%)	4 (28,6%)	
IMC¹ pregestacional (kg/m²)	29,82 ± 5,68	29,91 ± 5,04	0,966 ⁹
Primigesta	11 (23,9%)	2 (14,3%)	0,713 ¹⁰
Tabagismo	3 (6,52%)	0 (0%)	1,000 ¹⁰
IG² de início do pré-natal (semanas)*	14,82 ± 3,21	12,81 ± 3,26	0,045 ⁹
Outras doenças³	7 (15,2%)	2 (14,3%)	1,000 ¹⁰
PE⁴ prévia	12 (26,1%)	4 (28,6%)	1,000 ¹⁰
IG² parto (semanas)*	38,54 ± 1,36	36,39 ± 1,42	<0,001 ⁷
Via de parto			0,164 ⁸
Normal	8 (17,4%)	2 (14,3%)	
Fórcepe	6 (13,0%)	0 (0%)	
Cesárea	32 (69,6%)	12 (87,5%)	
Recém-nascido sexo masculino	28 (60,9%)	6 (42,9%)	0,234 ¹¹
Peso recém-nascido (gramas)*	3283 ± 464	2584 ± 523	<0,001 ⁷
Recém-nascido PIG⁵*	2 (4,35%)	5 (35,71%)	0,006 ¹⁰
Peso placenta (gramas)	462 ± 97	383 ± 112	0,014 ⁹
Diagnóstico de DMG⁶	15 (32,6%)	6 (42,9%)	0,532 ¹⁰
Alteração de vitalidade fetal anteparto	3 (6,52%)	1 (7,14%)	1,000 ¹⁰

HAC = hipertensão arterial crônica; HAC-PE= pré-eclâmpsia superajuntada; 1- IMC= Índice de massa corporal; 2- IG= idade gestacional; 3- Outras doenças apresentadas: ansiedade, asma leve, epilepsia, hipotireoidismo, miomatose, sífilis; 4- PE= pré-eclâmpsia; 5- PIG = pequeno para a idade gestacional; 6- DMG = diabetes *mellitus* gestacional; 7= teste Mann-Whitney; 8= Razão de Verossimilhança; 9= teste t-Student; 10= teste exato de Fisher; 11= teste Qui-quadrado. * indicam P<0,05

Comparamos, na sequência, alguns parâmetros indicativos de gravidade da doença entre as gestantes que desenvolveram PE ou HAC-PE (Tabela 4). Observamos que as pacientes com HAC-PE tiveram o diagnóstico da doença mais precocemente, embora a diferença não tenha alcançado significância estatística (P=0,126). Constatamos, ainda, que o diagnóstico de PE ocorreu antes de 34 semanas (PE precoce) em um dos quatro casos (25%) de PE na

coorte de gestantes inicialmente normotensas, e em 64,3% dos 14 casos de HAC-PE nas gestantes previamente hipertensas ($P=0,275$). Não foi observado nenhum caso de síndrome HELLP ou de eclâmpsia em nossa amostra e ocorreram dois casos de iminência de eclâmpsia, um em cada grupo ($P=0,405$).

Tabela 4 - Parâmetros indicativos de gravidade da doença nas gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada - HC-FMUSP - São Paulo, 2011-2014

	PE (n=4)	HAC-PE (n=14)	
	Média ± DP n (%)	Média ± DP n (%)	P
IG ¹ do diagnóstico de PE	35,75 ± 2,39	31,28 ± 5,29	0,126 ³
PE precoce (<34 sem)	1 (25,0%)	9 (64,3%)	0,275 ⁴
Síndrome HELLP ²	0 (0%)	0 (0%)	-
Iminência de Eclâmpsia	1 (25,0%)	1 (7,1%)	0,405 ⁴

PE = pré-eclâmpsia; HAC-PE = pré-eclâmpsia superajuntada; 1-IG = idade gestacional; 2-HELLP = síndrome HELLP, do acrônimo em inglês: *hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets*; 3 = teste t-Student; 4 = teste exato de Fisher

6.2 Comportamento dos fatores reguladores de angiogênese ao longo da gestação

Inicialmente, avaliamos o comportamento de cada marcador bioquímico ao longo da gestação dentro de cada grupo, incluindo para tal análise apenas as gestantes de quem foram obtidas todas as quatro amostras nas idades gestacionais programadas. Analisamos, assim, 276 amostras colhidas de 69 gestantes (27 gestantes normotensas e 42 hipertensas ao início do pré-natal).

Para gestantes normotensas, observamos que houve variação significativa dos fatores sFlt-1 ($P<0,001$), PIGF ($P<0,001$) e da razão sFlt-1/PIGF ($P<0,001$) ao longo da gestação. Já nas gestantes com pré-eclâmpsia, não foi observada diferença significativa para nenhum dos

parâmetros ao longo da gestação ($P=0,122$ para sFlt-1 e para PIGF e $P=0,072$ para razão sFlt-1/PIGF (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF nas idades gestacionais de 20, 26, 32 e 36 semanas, de acordo com o diagnóstico final de pré-eclâmpsia em gestantes previamente normotensas - HC-FMUSP - São Paulo, 2011 - 2014

	NT (n=24)			PE (n=3)		
	Mediana	(Intervalo Interquartil)	P ¹	Mediana	(Intervalo Interquartil) ²	P ¹
sFlt-1 (pg/mL)						
20 semanas	1705,93	(1021,36 - 2861,08)	<0,001	1575,69	(559,07 - 5847,67)	0,122
26 semanas	1566,86	(1004,66 - 2078,47)		1290,25	(1236,94 - 12276,25)	
32 semanas	2238,94	(1464,90 - 2923,64)		4210,55	(2610,77 - 4436,34)	
36 semanas	5102,23	(3013,13 - 6592,55)		6227,94	(5555,64 - 12400,76)	
PIGF (pg/mL)						
20 semanas	348,68	(225,69 - 452,10)	<0,001	209,78	(157,30 - 246,25)	0,122
26 semanas	819,78	(590,68 - 1369,32)		332,81	(236,83 - 966,88)	
32 semanas	874,85	(640,35 - 1668,33)		212,40	(126,98 - 462,87)	
36 semanas	561,81	(305,10 - 1030,99)		252,99	(116,87 - ,288,25)	
Razão sFlt-1/PIGF						
20 semanas	5,28	(2,63 - 9,84)	<0,001	6,40	(3,55 - 27,87)	0,072
26 semanas	1,84	(1,21 - 3,45)		5,34	(3,88 - 12,70)	
32 semanas	2,21	(1,31 - 4,94)		12,29	(9,10 - 12,29)	
36 semanas	7,34	(4,01 - 20,40)		49,02	(19,27 -53,29)	

NT= normotensa; PE= pré-eclâmpsia; 1= teste de Friedman para comparação dos biomarcadores sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF entre as coletas com 20, 26, 32 e 36 semanas de idade gestacional; 2 – pelo tamanho da amostra, o intervalo total está apresentado.

Na coorte de gestantes hipertensas, observamos resultados semelhantes. As mulheres com HAC (que não desenvolveram PE) apresentaram diferenças significativas ao longo da gestação para sFlt-1 ($P<0,001$), PIGF ($P<0,001$) e para razão sFlt-1/PIGF ($P<0,001$). Naquelas que apresentaram PE superajuntada não foi possível observar diferença significativa de nenhum dos marcadores entre as idades gestacionais ($P=0,136$).

para sFlt-1, $P=0,358$ para PIGF e $P=0,136$ para razão sFlt-1/PIGF), conforme apontado na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF nas idades gestacionais de 20, 26, 32 e 36 semanas, de acordo com o diagnóstico final de pré-eclâmpsia, em gestantes com hipertensão arterial crônica - HC-FMUSP - São Paulo, 2011- 2014

	HAC (n=34)			HAC-PE (n=8)		
	Mediana	(Intervalo Interquartil)	P ¹	Mediana	(Intervalo Interquartil)	P ¹
sFlt-1 (pg/mL)						
20 semanas	924,66	(678,79 - 1214,71)	<0,001	685,48	(495,76 - 3922,01)	0,136
26 semanas	1100,34	(729,07 - 1461,15)		756,89	(661,91 - 2521,96)	
32 semanas	1437,48	(1005,63 - 2686,24)		1916,96	(1268,81 - 2407,37)	
36 semanas	2914,91	(1632,74 - 6020,39)		2186,09	(1216,26 - 4130,55)	
PIGF (pg/mL)						
20 semanas	221,18	(157,48 - 376,93)	<0,001	274,99	(113,57 - 540,21)	0,358
26 semanas	487,09	(286,95 - 767,97)		454,47	(132,41 - 1104,70)	
32 semanas	491,89	(282,34 - 1030,05)		206,43	(2865,95 - 472,34)	
36 semanas	372,57	(178,93 - 718,99)		266,20	(884,17 - 584,64)	
Razão PIGF/sFlt-1						
20 semanas	3,56	(2,05 - 7,97)	<0,001	2,85	(1,46 - 43,80)	0,136
26 semanas	1,97	(1,23 - 5,35)		2,88	(1,03 - 5,99)	
32 semanas	2,42	(1,06 - 7,67)		9,46	(3,55 - 17,52)	
36 semanas	8,95	(3,06 - 34,19)		13,28	(2,52 - 30,99)	

HAC= hipertensão arterial crônica; HAC-PE= pré-eclâmpsia superajuntada; 1- teste de Friedman para comparação dos momentos de medição dos fatores dentro de cada grupo

Para avaliar os comportamentos dos biomarcadores ao longo da gravidez em cada grupo, avaliamos as diferenças entre momentos consecutivos de medição e realizamos comparações entre pares. Aplicando a correção de Bonferroni para comparações múltiplas, foram consideradas significativas diferenças com $P<0,008$. Os resultados estão representados nas figuras 1 a 4.

Figura 1- Comparação das dosagens consecutivas de sFlt-1, PlGF e da razão sFlt-1/PlGF em gestantes normotensas - HC-FMUSP - São Paulo, 2011-2014

Figura 2- Comparação das dosagens consecutivas de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF em gestantes com pré-eclâmpsia - HC-FMUSP - São Paulo, 2011-2014

Figura 3- Comparação das dosagens consecutivas de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF em gestantes com hipertensão arterial crônica - HC-FMUSP - São Paulo, 2011-2014

Figura 4- Comparação das dosagens consecutivas de sFlt-1, PlGF e da razão sFlt-1/PlGF em gestantes com pré-eclâmpsia superajuntada - HC-FMUSP - São Paulo, 2011-2014

Nas gestantes NT, observamos que o sFlt-1 manteve-se estável entre 20 e 26 semanas, apresentando aumento significativo entre 26 e 32 semanas e entre 32 e 36 semanas. Já o PIGF apresentou aumento inicial entre 20 e 26 semanas, mantendo-se estável até 32 semanas e caindo entre 32 e 36 semanas. Finalmente, a razão sFlt-1/PIGF apresentou queda entre 20 e 26 semanas, mantendo-se estável até 32 semanas e então subindo entre 32 e 36 semanas (Figura 1).

O grupo de gestantes com PE não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparados os quatro momentos de medição. Visualmente, observamos valores estáveis de sFlt-1 entre 20 e 26 semanas e depois aumento progressivo até 36 semanas. Para PIGF, aumento entre 20 e 26 semanas e depois queda progressiva até 36 semanas; a razão sFlt-1/PIGF apresentou queda entre 20 e 26 semanas e depois aumento progressivo até 36 semanas. No entanto, todas as diferenças entre medições consecutivas não alcançaram significância estatística (Figura 2).

Nas gestantes com HAC, o padrão foi semelhante ao observado para as NT para todos os fatores durante a gestação, exceto pelo sFlt-1, que apresentou aumento significativo entre 20 e 26 semanas neste grupo enquanto manteve-se com valores estáveis naquele (Figura 3).

O grupo de gestantes com HAC-PE não apresentou diferença significativa entre os quatro momentos de medição para nenhum dos fatores. Mesmo visualmente, as diferenças dos valores entre as idades gestacionais foram mais sutis. Os níveis de sFlt-1 pareceram constantes até 26 semanas, aumentando de maneira discreta até 32 semanas e depois permanecendo estáveis até 36 semanas. Quanto aos valores de PIGF, visualmente pareceram estáveis durante todas as medidas, com ligeira queda entre 26 e 32 semanas e sem apresentar a ascensão entre 20 e 26 semanas observada nos outros grupos. Finalmente, os valores da razão sFlt-1/PIGF pareceram aumentar de maneira discreta entre 20 e 26 semanas e entre 26 e 32 semanas, mantendo-se, então, estáveis entre 32 e 36 semanas. Também não verificamos neste grupo a queda da razão sFlt-1/PIGF entre 20 e 26 semanas apresentada pelos

demais. Mais uma vez, nenhuma destas diferenças apresentou significância estatística (Figura 4).

6.3 Comparações das medidas isoladas dos fatores reguladores de angiogênese e sua aplicação na predição de pré-eclâmpsia

Na sequência, fizemos comparações entre os grupos das dosagens dos biomarcadores em cada idade gestacional. Para isso avaliamos um total de 342 amostras, obtidas de 93 gestantes. Quando subdivididas por momento de mensuração, nas idades gestacionais de 20, 26, 32 e 36 semanas, as medidas dos marcadores apresentaram-se da seguinte forma entre os grupos:

A) sFlt-1

Observamos diferença nas dosagens de sFlt-1 entre os grupos de gestantes NT e HAC nas idades gestacionais de 20 semanas ($P=0,001$), 26 semanas ($P=0,049$) e 32 semanas ($P=0,037$), sendo maiores as medidas de sFlt-1 nas gestantes normais nos três momentos de medição (Figura 5).

Figura 5 - Dosagens do fator sFlt-1 ao longo da gravidez em gestantes normotensas (NT) e com hipertensão arterial crônica (HAC) - HC-FMUSP - São Paulo, 2011 - 2014

As gestantes com PE apresentaram valores significativamente maiores de sFlt-1 que o grupo NT na idade gestacional de 32 semanas ($P=0,019$), sem diferenças nas outras idades gestacionais (Tabela 7). Não observamos diferenças de valores de sFlt-1 entre os grupos HAC e HAC-PE em nenhum momento de medição (Tabela 8).

B) PIGF

Pudemos observar diferenças entre os valores de PIGF entre os grupos NT e HAC nas idades gestacionais de 20 ($P=0,033$), 26 ($P=0,010$) e 32 semanas ($P=0,012$), sendo maiores as medidas de PIGF nas gestantes NT em todas estas idades gestacionais (Figura 6).

Foram constatadas diferenças significativas entre as gestantes do grupo NT e PE nas idades gestacionais de 20 ($P=0,034$), 32 ($P=0,001$) e 36 semanas ($P=0,029$), sendo maiores as medidas no grupo NT que no grupo PE em todas estas idades gestacionais (Tabela 7).

Não houve diferença de PIGF entre os grupos HAC e HAC-PE em nenhuma idade gestacional (Tabela 8).

Figura 6 - Dosagens do fator PIGF ao longo da gravidez em gestantes normotensas (NT) e com hipertensão arterial crônica (HAC) - HC-FMUSP - São Paulo, 2011 - 2014

C) Razão sFlt-1/PIGF

Não foi verificada diferença na razão sFlt-1/PIGF entre os grupos NT e HAC em nenhuma idade gestacional (Figura 7).

Observamos diferença significativa da razão sFlt-1/PIGF entre os grupos NT e PE nas idades gestacionais de 26 ($P=0,004$), 32 ($P=0,001$) e 36 semanas ($P=0,029$), conforme apontado na Tabela 7, sendo maiores os valores da razão nas gestantes com PE.

Só foi significativa a diferença da razão sFlt-1/PIGF entre os grupos HAC e HAC-PE na idade gestacional de 32 semanas ($P=0,039$), sendo maior a razão no grupo HAC-PE, como apontado na Tabela 8.

Figura 7- Dosagens da razão sFlt-1/PIGF ao longo da gravidez em gestantes normotensas (NT) e com hipertensão arterial crônica (HAC) - HC-FMUSP - São Paulo, 2011-2014

Tabela 7 - Medidas séricas de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF em diferentes momentos da gestação, de acordo com o diagnóstico final de pré-eclâmpsia - HC-FMUSP - São Paulo, 2011 - 2014

	NT		PE		
	n	Mediana (IIQ)	n	Mediana (IIQ)	P ¹
sFlt-1 (pg/mL)					
20 semanas	28	1476,34 (1016,64 - 2430,80)	4	1195,33 (687,02 - 3711,68)	0,564
26 semanas	28	1566,86 (994,57 - 2,073,31)	4	2425,05 (1277,10 - 7918,05)	0,230
32 semanas*	27	2242,04 (1511,19 - 3013,80)	4	4323,45 (3410,66 - 13017,88)	0,019
36 semanas	26	4784,67 (2970,76 - 6287,07)	3	6227,94 (5555,64 - 12400,76) ²	0,150
PIGF (pg/mL)					
20 semanas*	28	337,38 (226,36 - 434,11)	4	183,54 (115,54 - 228,02)	0,034
26 semanas	28	819,78 (592,74 - 1367,88)	4	284,82 (152,98 - 649,85)	0,054
32 semanas*	27	792,53 (635,69 - 1468,84)	4	169,69 (89,38 - 337,64)	0,001
36 semanas*	26	561,81 (304,62 - 904,15)	3	252,99 (116,87 - 288,25) ²	0,029
Razão sFlt-1/PIGF					
20 semanas	28	5,28 (2,66 - 8,25)	4	8,73 (4,98 - 19,46)	0,279
26 semanas*	28	1,84 (1,16 - 3,41)	4	9,02 (4,61 - 32,1)	0,004
32 semanas*	27	2,55 (1,36 - 5,00)	4	23,61 (10,7 - 226,04)	0,001
36 semanas*	26	7,34 (4,01 - 19,68)	3	49,02 (19,27 - 53,29) ²	0,029

NT= normotensa; PE= pré-eclâmpsia; IIQ = intervalo interquartil; 1= teste de Mann-Whitney para comparação dos biomarcadores sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF entre as coletas com 20, 26, 32 e 36 semanas de idade gestacional; 2- pelo tamanho da amostra, o intervalo total está apresentado. * indicam P<0,05

Tabela 8 - Medidas séricas de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF em diferentes momentos da gestação, de acordo com o diagnóstico final de pré-eclâmpsia superajuntada - HC-FMUSP - São Paulo, 2011-2014

	HAC		HAC-PE		
	n	Mediana (IIQ)	n	Mediana (IIQ)	P ¹
sFlt-1 (pg/mL)					
20 semanas	38	924,66 (665,28 - 1192,84)	12	881,89 (578,07 - 3042,37)	0,666
26 semanas	42	1100,34 (733,12 - 1568,63)	13	1135,39 (747,84 - 2867,95)	0,663
32 semanas	46	1458,92 (988,86 - 3148,50)	13	2437,73 (1655,01 - 3894,96)	0,060
36 semanas	44	2914,91 (1631,14 - 5929,59)	10	2186,08 (1280,44 - 4080,74)	0,350
PIGF (pg/mL)					
20 semanas	38	208,04 (146,99 - 373,05)	12	291,10 (207,03 - 452,22)	0,318
26 semanas	42	497,69 (288,63 - 860,82)	13	482,50 (291,68 - 717,67)	0,677
32 semanas	46	551,68 (293,39 - 1000,52)	13	308,57 (151,04 - 427,72)	0,067
36 semanas	44	385,73 (178,39 - 762,61)	10	386,62 (187,18 - 620,73)	0,876
Razão sFlt-1/PIGF					
20 semanas	38	3,56 (2,06 - 8,06)	12	3,45 (1,77 - 9,96)	0,973
26 semanas	42	1,97 (1,29 - 4,49)	13	2,35 (1,47 - 5,99)	0,794
32 semanas*	46	2,51 (1,06 - 7,16)	13	9,98 (4,14 - 15,10)	0,039
36 semanas	44	8,95 (2,59 - 34,53)	10	7,25 (2,09 - 17,79)	0,841

HAC = hipertensão crônica; HAC-PE= pré-eclâmpsia superajuntada; IIQ = intervalo interquartil; 1= teste de Mann-Whitney para comparação dos biomarcadores sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF entre as coletas com 20, 26, 32 e 36 semanas de idade gestacional. * indica P<0,05

Comparando as dosagens dos fatores nas quatro idades gestacionais entre as pacientes que apresentaram PE e HAC-PE, só pudemos observar diferença significativa para sFlt-1 com 32 semanas (P=0,045) e com 36 semanas (P=0,049), com valores mais altos no grupo PE (Figura 8).

Figura 8 - Dosagens dos fatores sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF em gestantes com diagnóstico de pré-eclâmpsia (PE) e pré-eclâmpsia superajuntada (HAC-PE) - HC-FMUSP - São Paulo, 2011- 2014

Para os testes em que se encontrou diferença significativa entre os grupos que desenvolveram ou não PE a partir da coorte inicial, avaliamos a significância estatística e calculamos a área sob a curva ROC para diagnóstico de PE, conforme apontado na Tabela 9.

Tabela 9 - Análise *Receiver Operator Characteristics* (ROC) para avaliação do desempenho das medidas séricas de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF para diagnóstico de pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada. HC-FMUSP- São Paulo, 2011 - 2014

Desfecho / Biomarcador	AUC	P	IC 95%
Pré-eclâmpsia			
sFlt-1 32 semanas (pg/mL)	0,86	0,022	0,72 - 1,00
PIGF 20 semanas (pg/mL)	0,83	0,035	0,68 - 0,99
PIGF 32 semanas (pg/mL)	0,95	0,004	0,87 - 1,00
PIGF 36 semanas (pg/mL)	0,89	0,032	0,75 - 1,00
Razão sFlt-1/PIGF 26 semanas	0,92	0,007	0,81 - 1,00
Razão sFlt-1/PIGF 32 semanas	0,96	0,003	0,90 - 1,00
Razão sFlt-1/PIGF 36 semanas	0,89	0,032	0,75 - 1,00
Pré-eclâmpsia superajuntada			
Razão sFlt-1/PIGF 32 semanas	0,69	0,039	0,53 - 0,85

AUC = *area under curve*/ área sob a curva; IC 95% = intervalo de confiança 95%

Com base nas curvas ROC que apresentaram significância estatística, estimamos os pontos de corte de maior sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de PE e HAC-PE para cada fator, que estão descritos na Tabela 10.

Para predição de PE, observamos que a dosagem de PIGF menor ou igual a 249,73 pg/mL com 20 semanas de gestação apresentou acurácia de 84%, enquanto que a dosagem da razão sFlt-1/PIGF maior ou igual a 3,85 com 26 semanas apresentou acurácia de 91%. Em idade gestacional mais avançada, com 32 semanas, a dosagem da razão sFlt-1/PIGF maior ou igual a 8,62 alcançou acurácia de 94% para o diagnóstico da doença. Já para predição de HAC-PE, valores da razão sFlt-1/PIGF com 32 semanas maiores ou iguais a 8,05 determinaram 73% de acurácia.

Tabela 10 - Valores de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada pela dosagem de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF em diferentes idades gestacionais - HC - FMUSP - São Paulo, 2011 - 2014

Desfecho / Biomarcador	Ponto de corte	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia
Pré-eclâmpsia				
sFlt-1 32 semanas (pg/mL)	$\geq 2610,59$	1,00	0,70	0,85
PIGF 20 semanas (pg/mL)	$\leq 249,73$	1,00	0,68	0,84
PIGF 32 semanas (pg/mL)	$\leq 472,58$	1,00	0,85	0,93
PIGF 36 semanas (pg/mL)	$\leq 291,79$	1,00	0,81	0,90
Razão sFlt-1/PIGF 26 semanas	$\geq 3,85$	1,00	0,82	0,91
Razão sFlt-1/PIGF 32 semanas	$\geq 8,62$	1,00	0,89	0,94
Razão sFlt-1/PIGF 36 semanas	$\geq 17,17$	1,00	0,73	0,87
Pré-eclâmpsia superajuntada				
Razão sFlt-1/PIGF 32 semanas	$\geq 8,05$	0,69	0,76	0,73

6.4 Comparações das variações dos fatores reguladores de angiogênese e sua aplicação na predição de pré-eclâmpsia

Independentemente do valor dosado na primeira medida, estimamos a variação percentual de cada fator até a dosagem subsequente em cada intervalo de medição e comparamos a variação entre os grupos, de acordo com o desfecho de pré-eclâmpsia, como apontado nas tabelas 11 e 12.

Observamos, conforme demonstrado na Tabela 11, que a variação de sFlt-1 não apresentou diferença significativa entre os grupos NT e PE em nenhum intervalo de medição. Quanto ao PIGF, houve diferença entre os grupos no segundo intervalo, entre 26 e 32 semanas ($P=0,002$), quando houve tendência de aumento de PIGF no grupo NT e de queda no grupo PE. Quanto à razão sFlt-1/PIGF, também não pudemos observar diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 11 - Variação percentual das medidas seriadas de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF nos intervalos entre 20, 26, 32 e 36 semanas de gestação, de acordo com o diagnóstico final de pré-eclâmpsia - HC-FMUSP - São Paulo, 2011 - 2014

	NT		PE		
	n	Mediana (IIQ)	n	Mediana (IIQ)	P ¹
sFlt-1 (%)					
20 – 26 semanas	27	2,46 (-4,87 - 19,55)	4	233,80 (26,20 - 507,96)	0,094
26 – 32 semanas	26	22,24 (11,83 - 83,6)	4	176,67 (18,32 - 378,87)	0,198
32 – 36 semanas	26	108,14 (50,86 - 182,28)	3	112,80 (40,38 - 194,52) ²	1,000
PIGF (%)					
20 – 26 semanas	27	141,40 (78,16 - 226,80)	4	62,23 (3,3 - 202,11)	0,237
26 – 32 semanas*	26	11,68 (-5,37 - 56,46)	4	-41,28 (-49,26 - -30,63)	0,001
32 – 36 semanas	26	-38,83 (-49,47 - -26,93)	3	-7,96 (-45,35 - 35,71) ²	0,222
Razão sFlt-1/PIGF (%)					
20 – 26 semanas	27	-56,35 (-71,58 - -51,76)	4	53,73 (-35,93 - 232,30)	0,094
26 – 32 semanas	26	5,90 (-19,37 - 76,83)	4	385,66 (94,33 – 632,12)	0,071
32 – 36 semanas	26	287,05 (140,00 - 387,8)	3	56,79 (52,52 - 438,68) ²	0,563

NT = normotensa; PE= pré-eclâmpsia; IIQ = intervalo interquartil; 1= teste de Mann-Whitney para comparação da variação percentual dos biomarcadores sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF entre as coletas com 20, 26, 32 e 36 semanas de idade gestacional; 2- pelo tamanho da amostra, o intervalo total está apresentado. * indica P<0,05

Fazendo a mesma análise no grupo de gestantes com hipertensão arterial crônica (Tabela 12), não houve diferença na variação de sFlt-1 entre os grupos em nenhum intervalo. Constatamos que houve diferença entre os grupos para as variações percentuais de PIGF entre 20 e 26 semanas e entre 32 e 36 semanas. No primeiro intervalo foi menor o aumento de PIGF no grupo que apresentou HAC-PE (P=0,018). No terceiro intervalo, houve tendência de queda de PIGF no grupo HAC e de discreto aumento no grupo HAC-PE (P=0,032). Quanto à variação percentual da razão sFlt-1/PIGF, observamos diferença entre os grupos entre 20 e 26 semanas, quando houve tendência de queda no grupo HAC e de aumento no grupo HAC-PE (P= 0,033).

Tabela 12 - Variação percentual das medidas seriadas de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF nos intervalos entre 20, 26, 32 e 36 semanas de gestação, de acordo com o diagnóstico final de pré-eclâmpsia superajuntada - HC-FMUSP - São Paulo, 2011 - 2014

	HAC		HAC-PE		
	n	Mediana (IIQ)	n	Mediana (IIQ)	P ¹
sFlt-1 (%)					
20 – 26 semanas	35	14,22 (3,82 - 23,89)	11	0,07 (-3,40 - 39,85)	0,085
26 – 32 semanas	42	43,79 (16,17 - 121,02)	12	88,38 (1,43 - 235,67)	0,771
32 – 36 semanas	44	71,22 (26,63 - 174,43)	9	38,23 (-9,25 - 60,23)	0,407
PIGF (%)					
20 – 26 semanas*	35	97,19 (50,75 - 168,98)	11	51,31 (-7,42 - 111,48)	0,018
26 – 32 semanas	42	1,26 (-32,15 - 63,56)	12	-28,02 (-54,87 - 29,07)	0,236
32 – 36 semanas*	44	-29,88 (-53,02 - -6,25)	9	2,36 (-8,53 - 43,36)	0,032
Razão sFlt-1/PIGF (%)					
20 – 26 semanas*	35	-43,23 (-55,90 - -30,51)	11	-15,08 (-45,36 – 5,51)	0,033
26 – 32 semanas	42	47,80 (-25,23 - 179,59)	12	187,12 (-17,67 – 599,49)	0,318
32 – 36 semanas	44	165,83 (57,12 - 426,92)	9	34,93 (9,67 – 218,97)	0,077

HAC= hipertensão arterial crônica; HAC-PE= pré-eclâmpsia superajuntada; IIQ = intervalo interquartil; 1= teste de Mann-Whitney para comparação da variação percentual dos biomarcadores sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF entre as coletas com 20, 26, 32 e 36 semanas de idade gestacional; * indicam P<0,05

A Figura 9 ilustra como foi a variação percentual dos fatores sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF nos intervalos de medição para os quatro grupos. Por ela observamos que o aumento de sFlt-1 e da razão sFlt-1/PIGF foi mais pronunciada no grupo PE que em todos os demais tanto entre 20 e 26 semanas como entre 26 e 32 semanas. Observamos ainda que o grupo HAC-PE por vezes seguiu um padrão intermediário entre o grupo PE e as gestantes que não apresentaram PE na gravidez (HAC e NT).

Figura 9 - Variações proporcionais de sFlt-1, PIGF e da razão sFlt-1/PIGF nos intervalos entre 20-26, 26-32 e 32-36 semanas de gestantes normotensas (NT), com hipertensão arterial crônica (HAC), pré-eclâmpsia (PE) e pré-eclâmpsia superaiuntada (HAC-PE) - HC-FMUSP - São Paulo. 2011- 2014

À semelhança das dosagens isoladas dos fatores, fizemos, então, análise ROC e estimamos a área sob a curva para as variações dos fatores e intervalos de medição em que houve diferença significativa entre os grupos de interesse.

Para o diagnóstico de PE, a área sob a curva encontrada para a variação percentual de PIGF entre 26 e 32 semanas foi de 0,96 ($P=0,003$). Já para o diagnóstico de HAC-PE, a análise ROC indicou área sob a curva de 0,74 para variação de PIGF entre 20 e 26 semanas ($P=0,018$), 0,73 para variação de PIGF entre 32 e 36 semanas ($P=0,033$), e de 0,71 ($P=0,034$) para a variação da razão sFlt-1/PIGF entre 20 e 26 semanas (Tabela 13).

Tabela 13 - Análise *Receiver Operator Characteristics* (ROC) para avaliação do desempenho das medidas de variação de PIGF e da razão sFlt-1/PIGF para diagnóstico de pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada - HC-FMUSP - São Paulo, 2011 - 2014

Desfecho / Biomarcador	AUC	P	IC 95%
Pré-eclâmpsia			
Variação PIGF 26 - 32 semanas (%)	0,96	0,003	0,89 - 1,00
Pré-eclâmpsia superajuntada			
Variação PIGF 20 - 26 semanas (%)	0,74	0,018	0,58 - 0,90
Variação PIGF 32 - 36 semanas (%)	0,73	0,033	0,54 - 0,92
Variação razão sFlt-1/PIGF 20 - 26 semanas (%)	0,71	0,034	0,52 - 0,91

AUC = area under curve/ área sob a curva; IC 95% = intervalo de confiança 95%

Determinamos, então, ponto de maior sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de PE ou HAC-PE (Tabela 14). Constatamos que diminuição maior ou igual a 23,47% na dosagem de PIGF entre 26 e 32 semanas apresentou acurácia de 94% para predição de PE. Já para a predição de HAC-PE, entre 20 e 26 semanas, diminuição da razão sFlt-1/PIGF menor ou igual a 27,51% apresentou acurácia de 75% para o diagnóstico da doença.

Tabela 14 - Valores de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada pela variação de PIGF e da razão sFlt-1/PIGF nas dosagens seriadas em diferentes idades gestacionais - HC-FMUSP - São Paulo, 2011 - 2014

Desfecho / Biomarcador	Ponto de corte	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia
Pré-eclâmpsia				
Diminuição de PIGF 26 - 32 semanas (%)	$\geq 23,47$	1,00	0,88	0,94
Pré-eclâmpsia superajuntada				
Aumento de PIGF 20 - 26 semanas (%)	$\leq 120,71$	0,91	0,46	0,68
Diminuição de PIGF 32 - 36 semanas (%)	$\leq 22,71$	0,89	0,64	0,76
Diminuição da razão sFlt-1/PIGF 20 - 26 semanas (%)	$\leq 27,51$	0,64	0,86	0,75

7 DISCUSSÃO

Durante a última década muitos trabalhos foram realizados com o intuito de se identificar a fase pré-clínica da pré-eclâmpsia. Os resultados sobre a dosagem de fatores reguladores de angiogênese para este propósito têm se mostrado promissores. No entanto, para mulheres com hipertensão arterial crônica, estudos destes marcadores para predição de pré-eclâmpsia superajuntada são ainda muito escassos e controversos; não está estabelecido se estes fatores desempenham o mesmo papel nas duas situações.

7.1 Casuística e método

Algumas características do desenho deste estudo merecem considerações. Ao acompanharmos prospectivamente uma coorte de gestantes composta por um braço de mulheres normotensas e um braço de mulheres hipertensas, pudemos avaliar transversal e longitudinalmente as dosagens de sFlt-1, de PIGF e da razão sFlt-1/PIGF por amostras seriadas coletadas da mesma gestante ao longo da gravidez. Pudemos, ainda, realizar comparações entre os quatro grupos de gestantes: normotensas, com pré-eclâmpsia, hipertensas crônicas e com pré-eclâmpsia superajuntada. Muitos dos trabalhos previamente publicados são estudos tipo caso-controle, incluindo mulheres já com suspeita clínica de pré-eclâmpsia, ou então estudos aninhados de ensaios clínicos previamente desenhados para avaliar medidas de intervenção na pré-eclâmpsia e, portanto, mais sujeitos a vieses.

A avaliação prospectiva garantiu que o sangue analisado não tivesse ficado muito tempo armazenado, diferentemente do que se observa para ensaios constituídos de análises secundárias de estudos pregressos, cujas amostras de sangue apresentam tempo bem maior de armazenamento^{14,58}, aumentando a chance de danos às mesmas.

Além disso, outro ponto de destaque é que determinamos mais precisamente as idades gestacionais para coleta do sangue, em vez de intervalos de idades gestacionais para medição. Sabe-se que as concentrações de fatores reguladores de angiogênese variam ao longo da gestação e comparações de amostras em idades gestacionais distintas podem ser prejudicadas por esse comportamento dinâmico do sFlt-1 e do PlGF.

Outra peculiaridade deste trabalho é que o protocolo assistencial do nosso serviço prevê conduta conservadora, salvaguardadas condições de bem-estar materno e fetal, até 40 semanas para mulheres com pré-eclâmpsia em sua forma leve e até 37 semanas para casos de pré-eclâmpsia grave e pré-eclâmpsia superajuntada. Como muitos serviços preconizam resolução da gestação mais precoce nestas situações, em nossa casuística tivemos oportunidade de colher mais tardiamente, com até 36 semanas, o sangue de pacientes com formas graves de hipertensão.

Apesar do número crescente de publicações sobre o uso dos fatores reguladores de angiogênese para predição de pré-eclâmpsia em gestações de alto risco, a grande maioria dos trabalhos publicados combina a hipertensão arterial crônica com outras situações de risco aumentado, como diabetes, nuliparidade, obesidade, doença renal crônica e antecedente de pré-eclâmpsia^{78,79,81-84,87,89}, prejudicando a avaliação destes biomarcadores como ferramentas preditoras, especificamente, da pré-eclâmpsia superajuntada. Tendo em vista a maior incidência e a maior precocidade de pré-eclâmpsia nas gestantes com hipertensão arterial crônica, além da maior dificuldade de diagnóstico desses casos, o uso de métodos preditores de pré-eclâmpsia superajuntada seria particularmente interessante nesse grupo e este foi um de nossos objetivos.

Outro aspecto relevante é que obtivemos os dados do parto e do término da gestação de todas as nossas gestantes, para assegurar que não houvesse casos diagnosticados tardiamente para pré-eclâmpsia e que tivessem sido inadvertidamente mal alocados nos grupos de interesse.

Uma das limitações de nosso trabalho é o tamanho da amostra, especialmente para o grupo de gestantes com pré-eclâmpsia. O tamanho amostral de nossa casuística foi baseado nas diferenças de dosagens isoladas dos fatores sFlt-1 e PIGF entre pacientes que desenvolveram ou não pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada para, assim, avaliarmos estes biomarcadores como ferramentas preditoras da doença. Mesmo com o número pequeno de gestantes no grupo pré-eclâmpsia, obtivemos êxito para este objetivo, em conformidade com dados da literatura. No entanto, esta amostra não nos permitiu subclassificar o grupo de gestantes com pré-eclâmpsia conforme a gravidade ou a idade gestacional de surgimento da doença, o que, apesar de não ser objetivo deste estudo, poderia ser bastante relevante para a prática clínica. As comparações das variações dos fatores angiogênicos entre as idades gestacionais de medição também podem ter sido prejudicadas pelo tamanho pequeno da amostra, implicando menor poder para os testes de comparação, já que o cálculo amostral não foi baseado nas diferenças das variações dos biomarcadores, dado indisponível na literatura.

Quando avaliamos as características basais de nossa população alguns aspectos merecem discussão.

Comparando-se a coorte de gestantes normotensas à coorte de gestantes hipertensas, observamos que este último grupo apresentava maior idade e maior IMC pregestacional. Este dado não nos surpreendeu, uma vez que a idade e o sobrepeso/obesidade são fatores de risco para hipertensão arterial crônica. Embora não houvesse significância estatística, também foi maior a proporção de mulheres de cor preta no grupo de gestantes hipertensas, o que também era esperado, uma vez que se trata de fator de risco epidemiológico⁹⁰.

Constatamos maior frequência de relato de antecedente de pré-eclâmpsia nas gestantes com hipertensão arterial crônica. Por tratar-se de informação referida pela gestante, não podemos, contudo, concluir se este achado deve-se ao maior risco de hipertensão arterial crônica ao longo da vida em mulheres que apresentaram pré-eclâmpsia ou ao diagnóstico equivocado

de pré-eclâmpsia prévia, sendo possível que a mesma apresentasse, à ocasião, outra forma de síndrome hipertensiva na gestação.

Observamos que as gestantes com hipertensão arterial crônica iniciaram pré-natal mais tardiamente em nosso serviço. Acreditamos que tal atraso seja decorrente do tempo de encaminhamento da unidade básica de saúde para a rede terciária de atendimento, uma vez que são consideradas gestações de alto risco. As gestantes normotensas são, majoritariamente, funcionárias e familiares de funcionárias deste hospital (que tem características terciárias de atendimento), ou então mulheres que já fizeram pré-natais anteriores em nosso ambulatório e, portanto, matriculam-se diretamente neste serviço, sem passagem pela unidade básica de saúde.

Destacamos também a alta média de índice de massa corporal encontrada em nossa amostra como um todo, o que aponta para a grande prevalência de sobrepeso e obesidade em nossas gestantes, fator de risco importante para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia¹³.

Quando divididos os dois grupos de gestantes de acordo com o diagnóstico de pré-eclâmpsia, surpreendeu-nos a alta frequência deste diagnóstico entre nossas gestantes previamente normotensas. Apesar de observarmos, dentre elas, 8,1% de mulheres que referiam pré-eclâmpsia em gestações anteriores, idade materna média de quase 30 anos e índice de massa corporal médio de 26,15 kg/m², o achado de que 21,6% das gestantes apresentaram diagnóstico de pré-eclâmpsia não pode ser, de outra forma, explicado. Mesmo quando avaliamos apenas os casos em que se caracterizou proteinúria positiva, nossa incidência foi alta quando comparada às descritas pela maioria dos autores. No entanto, foi condizente com aquela relatada em nossa Clínica em publicações da década de 80^{12,29}.

Neste contexto, vale ressaltar a alta incidência de diabetes gestacional encontrada em nossa casuística: 22,2% nas gestantes que se mantiveram normotensas e 37,5% nas gestantes com diagnóstico de pré-eclâmpsia. Quando avaliadas apenas as gestantes cuja proteinúria foi positiva, 50% delas

apresentaram diabetes gestacional. Sabe-se que o diabetes gestacional é fator associado ao diagnóstico de pré-eclâmpsia⁹¹. A alta frequência desta condição em nossa população também pode ter contribuído para a elevada incidência de pré-eclâmpsia encontrada e aponta para a mudança do perfil epidemiológico de nossas gestantes, que, em concordância com a população geral, conhece uma pandemia de síndrome metabólica. Em nossa coorte de gestantes hipertensas este dado é ainda mais alarmante: o diagnóstico de diabetes gestacional ocorreu em 32,6% das gestantes com hipertensão arterial crônica e em 42,9% das gestantes com pré-eclâmpsia superajuntada, reforçando a associação que existe entre síndromes hipertensivas, obesidade e distúrbio do metabolismo glicêmico.

Ainda sobre os desfechos gestacionais de nossa casuística, não nos surpreendeu o achado de que gestantes com pré-eclâmpsia apresentaram parto em idade gestacional mais precoce, recém-nascidos de menor peso e maior frequência de alteração de vitalidade fetal anteparto, desfechos consistentemente associados ao diagnóstico desta doença. Conquanto a frequência de alteração de vitalidade fetal não ter sido maior nas gestantes com pré-eclâmpsia superajuntada, da mesma forma observamos partos em idades gestacionais mais precoces e menor peso dos recém-nascidos nas gestantes que apresentaram o diagnóstico da doença. Esses resultados ratificam a importância clínica da pré-eclâmpsia sobre os resultados perinatais.

Apesar de não termos observado casos mais extremos de pré-eclâmpsia, com diagnóstico de eclâmpsia ou síndrome HELLP, constatamos que mais de 60% das gestantes com pré-eclâmpsia superajuntada receberam o diagnóstico antes de 34 semanas de gestação. Tenha-se em mente que gestantes com pré-eclâmpsia superajuntada permanecem internadas desde o diagnóstico até o parto e ficam evidentes a morbidade e os impactos financeiro, social e psicológico que este diagnóstico acarreta.

7.2 Comportamento dos fatores reguladores de angiogênese ao longo da gestação

Ao estudarmos as concentrações dos fatores reguladores de angiogênese nas gestantes de nossa população, observamos que para todos os grupos e fatores os valores dosados não obedeciam a uma distribuição normal. Observamos, ainda, que dentro de um mesmo grupo de gestantes foi bastante grande a variação das dosagens dos fatores na mesma idade gestacional, com desvios-padrões e intervalos interquartis amplos. Analisando resultados de outros autores, constatamos que esta é uma característica comum apresentada nos estudos sobre fatores angiogênicos na gestação, evidenciando que as dosagens dos mesmos são muito heterogêneas na população. A maioria dos artigos publicados utiliza-se de transformação dos dados para análise estatística e apresentação de resultados. Optamos, contudo, por apresentar os nossos dados em sua forma original, sem transformação ou ajuste para análise estatística, pois acreditamos que os valores reais dos resultados dos testes representem melhor a interpretação clínica.

Nossos resultados sobre o comportamento dos fatores angiogênicos ao longo da gestação foram concordantes com dados descritos na literatura.

As dosagens de PIGF nas gestantes normotensas aumentaram até 26 semanas, mantendo-se estáveis até 32 semanas, a partir de quando diminuiriam até 36 semanas. Outros autores observaram comportamento semelhante, com aumento progressivo de PIGF até o início do terceiro trimestre e, então, diminuição até o parto^{14,58,60,71}.

Quanto aos níveis de sFlt-1, observamos aumentos progressivos dos valores em gestantes normotensas, a partir de 26 semanas e até 36 semanas. Outros autores apontam de forma semelhante para este aumento de sFlt-1 mais tardio na gestação^{58,71}. Levine et al. (2004) descreveram que as concentrações de sFlt-1 em gestantes normotensas aumentaram um pouco mais tardiamente do que observamos em nossa amostra, a partir de 33

semanas gestacionais. Todos os autores, no entanto, concordam que a elevação de sFlt-1 é um evento mais tardio na gravidez¹⁴.

A razão sFlt-1/PIGF em nossas gestantes normotensas apresentou diminuição entre 20 e 26 semanas, mantendo-se em níveis estáveis até 32 semanas e então aumentando até 36 semanas, padrão semelhante aos descritos por Palm et al. (2011) e Leañós-Miranda et al. (2012) em suas casuísticas^{58,71}.

O aumento progressivo de PIGF até o início do terceiro trimestre pode ser reflexo do crescimento da placenta, já que o trofoblasto é a principal fonte do fator durante a gestação. O PIGF sofre regulação negativa em regime de hipóxia e, com o avançar da gestação, condições de hipóxia relativa podem determinar a diminuição do mesmo. Além disso, o aumento progressivo da expressão de sFlt-1, que sofre regulação positiva em regime de hipóxia⁹², também pode ser responsável pela diminuição observada do PIGF durante o terceiro trimestre da gestação, já que o sFlt-1 atua como antagonista do PIGF, ao ligar-se ao fator sem promover atividade intracelular e diminuir os níveis de sua forma livre circulante^{15,22,58}.

Uma vez que a razão sFlt-1/PIGF tende a aumentar no final da gravidez mesmo em gestações normais, é menor o poder discriminatório deste biomarcador entre os grupos, o que poderia, inclusive, limitar sua aplicação clínica para predição da pré-eclâmpsia em idades gestacionais mais avançadas⁹³.

Ainda sobre o comportamento dos fatores angiogênicos no decorrer da gestação, observamos que as gestantes com hipertensão arterial crônica apresentaram padrões de comportamento de PIGF e da razão sFlt-1/PIGF bastante semelhantes aos das gestantes normotensas. A única diferença observada entre os grupos é que as gestantes com hipertensão arterial crônica apresentaram aumento pouco mais precoce do sFlt-1, já a partir de 20 semanas. Apesar de estar primordialmente envolvido com a regulação da angiogênese, sabe-se hoje que existe expressão de sFlt-1 por outros tipos celulares, como macrófagos e outras células do sistema imunológico, e que

este fator também está envolvido na resposta inflamatória. É possível que os níveis de sFlt-1 tenham aumentado mais precocemente nas gestantes com HAC em função de algum grau de inflamação crônica ou de lesão endotelial prévia subjacente^{43,47,48}. Não encontramos dados da literatura comparando o comportamento destes fatores angiogênicos entre gestantes normotensas e com hipertensão arterial crônica para comparação com nossos resultados.

Em nossa casuística observamos que as variações dos fatores angiogênicos ao longo da gestação foram menos pronunciadas nas mulheres que tiveram diagnóstico de pré-eclâmpsia ou pré-eclâmpsia superajuntada, não tendo nenhum dos grupos apresentando diferenças significativas entre os momentos de medição. Torry et al. (1998) já apontavam para diferenças no comportamento dos fatores angiogênicos em gestantes com pré-eclâmpsia em sua população de estudo e obtiveram resultado semelhante para as dosagens de PIGF ao longo da gravidez⁶⁰.

Apesar de não ter alcançado significância estatística, graficamente observamos que nas pacientes que apresentaram pré-eclâmpsia ou pré-eclâmpsia superajuntada foi mais precoce a queda dos níveis de PIGF, a qual iniciou-se já a partir de 26 semanas. Nos grupos que desenvolveram pré-eclâmpsia também observamos queda menos pronunciada da razão sFlt-1/PIGF entre 20 e 26 semanas de gestação. Como quedas de PIGF e valores mais altos da razão sFlt-1/PIGF denotam estado mais antiangiogênico, nossos achados sugerem que as gestantes que apresentaram pré-eclâmpsia ou pré-eclâmpsia superajuntada tiveram maior desbalanço para estado antiangiogênico em idade gestacional mais precoce, já no segundo trimestre, quando comparadas àquelas que permaneceram sem o diagnóstico de pré-eclâmpsia.

Apesar de ser inerente ao método de comparação múltipla de amostras relacionadas, é preciso apontar que, ao compararmos apenas pacientes de quem se tenha obtido as quatro amostras para a avaliação do comportamento dos fatores angiogênicos ao longo da gestação, excluimos aquelas potencialmente mais graves, cujo parto tenha sido indicado antes de 36 semanas (por motivos maternos ou fetais), e que, portanto, não contribuíram

com as quatro amostras. Este aspecto merece atenção e atenta para a necessidade de cautela quando da generalização destes resultados.

7.3 Comparações das medidas isoladas dos fatores reguladores de angiogênese entre os grupos.

Ao compararmos as dosagens dos fatores angiogênicos nas medidas isoladas de gestantes normotensas e com hipertensão arterial crônica, observamos valores significativamente menores de sFlt-1 nas gestantes hipertensas nas idades gestacionais de 20, 26 e 32 semanas. Igualmente, nestas mesmas idades gestacionais, observamos valores significativamente menores de PIGF nas gestantes hipertensas. Avaliando-se, no entanto, as dosagens da razão sFlt-1/PIGF entre os grupos, não houve diferença significativa em nenhuma das idades gestacionais. Estudos recentes vêm apontando para níveis menores de sFlt-1 e de PIGF em mulheres obesas, quando comparadas a mulheres não obesas^{41,43,45}. Embora a literatura seja escassa de comparações sobre as dosagens de fatores angiogênicos entre mulheres normotensas e aquelas com hipertensão arterial crônica, acreditamos que essa diminuição de sFlt-1 e PIGF nas gestantes hipertensas possa ser secundária ao maior índice de massa corporal apresentado por estas quando comparadas às gestantes normotensas.

Apesar do número pequeno de gestantes, identificamos diferença significativa para dosagens de sFlt-1 entre gestantes normotensas e gestantes com pré-eclâmpsia na idade gestacional de 32 semanas, de PIGF com 20, 32 e 36 semanas de gestação, e da razão sFlt-1/PIGF nas idades gestacionais de 26, 32 e 36 semanas, em concordância com dados da literatura que apontam que nas pacientes com pré-eclâmpsia as dosagens de PIGF estão constante e precocemente diminuídas e que as dosagens de sFlt-1 e da razão sFlt-1/PIGF estão aumentadas, especialmente em fases mais tardias da gestação^{14,16,26,50,62,69,71,94}.

Uma vez que as diferenças nos níveis de sFlt-1 e da razão sFlt-1/PIGF apenas evidenciaram-se em idades gestacionais mais tardias nas gestantes que apresentaram pré-eclâmpsia, questionamo-nos se o aumento destes marcadores não poderia estar mais relacionado à expressão fenotípica da doença do que propriamente ao seu mecanismo etiológico. A expressão aumentada de sFlt-1, com consequente aumento da razão sFlt-1/PIGF, poderia ser secundária à doença já instalada e levar à expressão clínica da pré-eclâmpsia (hipertensão e proteinúria) pelo acometimento endotelial⁶¹. Já as dosagens de PIGF encontram-se mais precocemente alteradas nas gestantes com pré-eclâmpsia⁹⁵, parecendo mais provável que desregulações na expressão do PIGF estivessem mais relacionadas à etiologia da doença e desregulações do sFlt-1 mais relacionadas à expressão clínica da mesma.

Corroboram com essa hipótese, por exemplo, os trabalhos de Akolekar et al. (2010) e de Myatt et al. (2012), que descreveram diferenças de PIGF já no primeiro trimestre em gestantes que apresentaram pré-eclâmpsia, mas não detectaram diferenças nas dosagens precoces de sFlt-1^{36,95}. O PIGF teria, assim, papel mais importante na predição precoce da doença e o sFlt-1 apresentaria diferença entre os grupos apenas mais tardiamente. Nesse sentido, alguns autores apontam que sua dosagem poderia ser particularmente mais útil como ferramenta de avaliação prognóstica em mulheres com quadro clínico de pré-eclâmpsia, estando valores mais altos desse parâmetro associados a maior frequência de desfechos adversos nestas gestantes^{73,93,96,97}.

Por sua vez, para a coorte de gestantes hipertensas, as comparações dos fatores angiogênicos entre pacientes com hipertensão arterial crônica e pré-eclâmpsia superajuntada não apresentaram resultados tão consistentes. Apesar de ter sido maior o número de gestantes avaliadas nesses grupos, em nossa casuística as dosagens isoladas de sFlt-1 e de PIGF não foram capazes de distinguir as gestantes que apresentaram pré-eclâmpsia superajuntada; apenas a razão sFlt-1/PIGF na idade gestacional de 32 semanas foi diferente entre os grupos, sendo maior no grupo com pré-eclâmpsia superajuntada. Este achado sugere-nos participação distinta do desbalanço antiangiogênico na

etiopatogenia da pré-eclâmpsia superajuntada, quando comparada à pré-eclâmpsia em sua forma “pura”.

De fato, os dados da literatura são mais escassos e controversos para a avaliação específica desses grupos de gestantes. Nossos achados estão de acordo com aqueles publicados por Powers et al. (2010), que não observaram diferença significativa nas concentrações de PIGF em nenhuma idade gestacional para gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia superajuntada quando comparadas àquelas que permaneceram apenas com hipertensão arterial crônica. A dosagem de sFlt-1 descrita pelos autores, no entanto, foi maior nas gestantes com pré-eclâmpsia superajuntada na janela entre 26 e 30 semanas de idade gestacional. Os autores não compararam transversalmente os níveis da razão sFlt-1/PIGF entre os grupos. Por estes achados, em concordância com os nossos e em comparação com aqueles apresentados para nossa coorte de gestantes normotensas, poderíamos supor que os níveis aumentados mais tardiamente de sFlt-1 e da razão sFlt-1/PIGF nas gestações com pré-eclâmpsia superajuntada representariam mais a expressão fenotípica da doença; a ausência de diferença nas dosagens de PIGF (principalmente em fases mais precoces da gestação) sugeriria um papel de menor destaque do desbalanço angiogênico na fisiopatogenia da pré-eclâmpsia superajuntada quando em comparação com a pré-eclâmpsia em sua forma “pura”, não superajuntada⁸⁵.

Em contraposição aos nossos resultados, Perni et al. (2012) relataram valores significativamente mais baixos de PIGF com 20 semanas de gestação em mulheres que desenvolveram pré-eclâmpsia superajuntada precoce (antes de 34 semanas), mas não naquelas que apresentaram pré-eclâmpsia superajuntada tardia. Para este grupo, apenas após 28 semanas de gestação foi possível apontar níveis significativamente menores de PIGF naquelas que desenvolveram a doença. Os autores também apontaram que para aquelas com pré-eclâmpsia precoce os valores de sFlt-1 e da razão sFlt-1/PIGF já eram significativamente maiores com 20 semanas gestacionais⁸⁶.

Não foi objetivo desta análise subclassificar as gestantes de acordo com a idade gestacional do diagnóstico. Talvez seja este um motivo para a

diferença entre nossos resultados e os de Perni et al. (2012), mas não podemos afastar a hipótese de que a pré-eclâmpsia superajuntada englobe um grupo mais heterogêneo da doença, com mecanismos fisiopatogênicos diversos.

É possível que as diferenças dos fatores reguladores de angiogênese nas gestantes com pré-eclâmpsia superajuntada sejam menos evidentes, quando comparadas às com hipertensão arterial crônica, porque estas mulheres teriam um limiar mais baixo para o desbalanço angiogênico como agente fisiopatogênico da pré-eclâmpsia, pois já apresentariam algum grau de lesão endotelial crônica subjacente. Sendo assim, graus menores de desbalanço seriam suficientes para deflagrar a doença. Também é possível que a pré-eclâmpsia superajuntada apresente mecanismos fisiopatogênicos distintos da pré-eclâmpsia em sua forma “pura”, e que, para elas, o desbalanço angiogênico tenha papel de menor importância, em favor de outros fatores etiológicos. Nosso estudo não permite, no entanto, conclusões sobre estas hipóteses.

Alguns autores já atentaram para a existência de pré-eclâmpsia em mulheres com balanço angiogênico normal⁹⁸. Rana et al. (2014) apontaram que gestantes com pré-eclâmpsia e perfil angiogênico normal eram mais frequentemente obesas e apresentavam diabetes pregestacional, cogitando que estas mulheres já pudessem apresentar alguma lesão endotelial subjacente⁹⁹. Em nossa amostra, apesar de termos excluído gestantes com diabetes pregestacional, destacamos que a coorte de gestantes hipertensas apresentava maior IMC que a de gestantes normotensas. Este dado, associado ao diagnóstico prévio da hipertensão arterial nestas mulheres, leva-nos a pensar que temos neste grupo pacientes mais susceptíveis à pré-eclâmpsia, com limiar mais baixo para o desenvolvimento da doença, em quem diferenças mais sutis no balanço angiogênico pudessem ser suficientes para deflagrá-la. Os resultados de Levine et al. (2006) também contribuem para esta hipótese, uma vez que em sua amostra de gestantes com pré-eclâmpsia observaram que aquelas que com valores mais baixos de sFlt-1 apresentavam maiores níveis

de pressão arterial na metade da gravidez, sugerindo que a condição subjacente do endotélio predispusse à doença¹⁰⁰.

A heterogeneidade da pré-eclâmpsia é uma característica frequentemente destacada na literatura, o que reflete, inclusive, em seu variado espectro de apresentações clínicas^{101,102}. Nas pacientes com pré-eclâmpsia superajuntada essa heterogeneidade parece ainda mais acentuada e pode ser decorrente do envolvimento de distintos mecanismos fisiopatogênicos.

Staff et al. (2013) propõem que existiriam dois tipos de pré-eclâmpsia, a “materna” e a “placentária”. A primeira estaria mais relacionada a vasculopatias maternas prévias e apresentar-se-ia de forma mais branda e menos associada à insuficiência placentária ou à restrição de crescimento fetal. A forma “placentária”, no entanto, seria mais associada ao desbalanço angiogênico, cursando de forma mais agressiva, com insuficiência placentária e restrição de crescimento fetal. Evidentemente, as duas formas poderiam sobrepor-se. Em nossa amostra não subclassificamos as pacientes com pré-eclâmpsia de acordo com a ocorrência de insuficiência placentária ou RCF, mas é possível que, particularmente no grupo pré-eclâmpsia superajuntada, essas diferenças nos quadros clínicos pudessem influenciar nas comparações dos fatores angiogênicos entre os grupos⁷.

Ao compararmos as concentrações dos fatores angiogênicos entre pacientes com pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada constatamos que os níveis de sFlt-1 eram maiores com 32 e 36 semanas nas gestantes com pré-eclâmpsia “pura”, resultado semelhante àquele apresentado por Dwyer et al. (2010) e que corrobora com a hipótese de que o desbalanço angiogênico é mais acentuado nas gestantes com pré-eclâmpsia “pura” que na forma superajuntada⁸⁰.

Finalmente, pensando em perspectivas futuras, já foi proposto que a retirada por aférese do sFlt-1 poderia melhorar o quadro clínico de gestantes com pré-eclâmpsia e postergar a necessidade do parto¹⁰³. Frente aos nossos resultados, parece-nos que esse tipo de intervenção terapêutica seria mais efetivo naquelas gestantes com pré-eclâmpsia em sua forma “pura” e que sua

aplicação na pré-eclâmpsia superajuntada deveria ser investigada com ainda mais cautela, já que o desbalanço angiogênico pode desempenhar papel menos decisivo para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia superajuntada.

7.4 Comparações das variações dos fatores reguladores de angiogênese nas gestantes que apresentaram pré-eclâmpsia

Ao avaliarmos, longitudinalmente, a evolução dinâmica dos fatores reguladores de angiogênese para gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia, observamos que, apesar da diferença significativa nas concentrações de sFlt-1 com 32 semanas, PIGF com 20, 32 e 36 semanas e da razão sFlt-1/PIGF com 26, 32 e 36 semanas, as taxas de variação percentual destes fatores entre as idades gestacionais de coleta foram semelhantes às das gestantes normotensas. Apenas o comportamento do PIGF entre 26 e 32 semanas foi estatisticamente diferente entre os grupos, quando houve tendência de queda no grupo que desenvolveu pré-eclâmpsia e tendência de aumento no grupo que se manteve normotenso.

Em outras palavras, apesar de os níveis dos fatores serem diferentes entre os grupos em diversos momentos da gestação, sua variação proporcional foi semelhante entre eles nos intervalos avaliados, exceto para o PIGF entre 26 e 32 semanas.

De forma interessante, na coorte de gestantes hipertensas, apesar de apenas a razão sFlt-1/PIGF ter sido diferente na idade gestacional de 32 semanas no grupo que desenvolveu pré-eclâmpsia superajuntada, pudemos constatar que a variação percentual destes fatores foi diferente entre os grupos, permitindo discriminar mais precocemente aquelas gestantes que desenvolveriam pré-eclâmpsia superajuntada. Observamos que gestantes que apresentariam a doença tiveram um aumento percentual menor na dosagem de PIGF entre 20 e 26 semanas e também uma queda menor da razão sFlt-1/PIGF

neste mesmo intervalo de medição, quando comparadas a gestantes que permaneceram apenas com hipertensão arterial crônica.

Em outras palavras, apesar de os níveis de PIGF e da razão sFlt-1/PIGF serem semelhantes entre os grupos com 20 e 26 semanas, as gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia superajuntada apresentaram menor capacidade de promover estado pró-angiogênico no segundo trimestre (aumentaram menos os níveis de PIGF e diminuíram menos a razão sFlt-1/PIGF) que as gestantes que não apresentam a doença. Talvez esse comportamento possa representar um padrão de resposta diferente de um endotélio já previamente lesado para aquelas que desenvolvem pré-eclâmpsia. Dessa forma, apesar de não termos encontrado diferenças tão consistentes nas dosagens isoladas dos biomarcadores, a avaliação seriada dos mesmos pôde melhorar e antecipar a identificação de gestantes que desenvolveriam pré-eclâmpsia superajuntada.

O fato de haver grande heterogeneidade na agressividade e no tempo de doença das gestantes com hipertensão arterial crônica (o que pode refletir diferentes graus de lesão endotelial previamente estabelecida) pode interferir de maneira relevante na fisiopatogenia da doença e também pode prejudicar a avaliação do efeito das dosagens dos fatores reguladores de angiogênese no diagnóstico de pré-eclâmpsia superajuntada. Para avaliar esta interação, seria importante estratificar o grupo de gestantes hipertensas crônicas com riscos semelhantes de lesão endotelial, seja por índice de massa corporal, por tempo de doença, por necessidade e número de drogas anti-hipertensivas e também pelo controle ou descontrole pressórico quando do início do pré-natal. Estudos adicionais com este objetivo seriam muito relevantes para se avaliar os comportamentos dos fatores reguladores de angiogênese nos subgrupos de gestantes com hipertensão arterial crônica e, assim, verificar seu potencial efeito no diagnóstico de pré-eclâmpsia superajuntada.

7.5 Fatores angiogênicos como ferramentas preditoras de pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada

Avaliando-se as capacidades de predição de pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada pelos fatores reguladores de angiogênese sFlt-1, PIGF e pela razão sFlt-1/PIGF, observamos resultados semelhantes aos da literatura para o grupo de gestantes com pré-eclâmpsia. Para o grupo com pré-eclâmpsia superajuntada, a literatura existente é mais escassa e controversa.

Para nossa coorte de gestantes normotensas foi possível prever a ocorrência de pré-eclâmpsia pelas dosagens de sFlt-1 com 32 semanas, de PIGF com 20, 32 e 36 semanas, pela razão sFlt-1/PIGF com 26, 32 e 36 semanas e pela variação de PIGF entre 26 e 32 semanas. De acordo com a idade gestacional, as análises ROC apresentaram maiores áreas sob a curva de 0,83 para PIGF com 20 semanas, de 0,92 para razão sFlt-1/PIGF com 26 semanas, de 0,96 para razão sFlt-1/PIGF com 32 semanas, de 0,96 para a variação de PIGF entre 26 e 32 semanas e de 0,89 tanto para PIGF como para a razão sFlt-1/PIGF com 36 semanas. Esses bons desempenhos estão de acordo com os descritos por outros autores, que também apresentam em suas casuísticas algumas variações.

McElrath et al. (2012), por exemplo, obtiveram as maiores áreas sob a curva com 35 semanas de gestação (área de 0,72 para sFlt-1 e para PIGF e área de 0,74 para a razão sFlt1/PIGF). Em idades gestacionais mais precoces os autores encontraram desempenhos mais modestos, com área sob a curva máxima de 0,66 para PIGF com 24 semanas de gestação. Apresentando valores de corte para os testes, os autores apontaram que níveis de PIGF menores ou iguais a 242,47 pg/mL com 35 semanas gestacionais apresentavam sensibilidade de 67,8% e especificidade de 64,8% para diagnóstico de pré-eclâmpsia²⁶.

Por sua vez, Ghosh et al. (2012) apresentaram em sua casuística área sob a curva de 0,988 para predição de pré-eclâmpsia precoce pela dosagem de PIGF com 22-24 semanas, atingindo sensibilidade de 100% e especificidade de 96,3% para valores de PIGF menores ou iguais a 144 pg/mL⁷⁷.

As divergências entre os valores apresentados podem ser secundárias a diferenças na gravidade da pré-eclâmpsia identificada entre os grupos, sugerida pela idade gestacional precoce de surgimento da doença apontada na casuística de Ghosh et al (2012)⁷⁷.

Em gestações de alto risco para pré-eclâmpsia, os resultados entre autores sobre a capacidade de predição da doença pela dosagem de fatores angiogênicos são bastante divergentes.

Alguns apresentam em suas análises desempenhos bastante semelhantes àqueles das gestantes de baixo risco. Shaker et al. (2011) apontaram área sob a curva de 0,867 para PIGF e de 0,901 para sFlt-1, dosados entre 22 e 26 semanas de gestação⁸¹. Teixeira et al. (2013) também apresentaram bom desempenho, com área sob a curva de 0,90 para PIGF, de 0,78 para sFlt-1 e de 0,95 para razão sFlt-1/PIGF dosados por volta de 26 semanas gestacionais⁸². Simas et al.(2014), por sua vez, relataram área sob a curva de 0,85 para sFlt-1, dosado entre 28 e 32 semanas, e de 0,91 para sFlt-1 dosado entre 23 e 28 semanas⁸³.

Por outro lado, Sibai et al. (2008) observaram resultados mais modestos nas gestações de alto risco e, para dosagem entre 24 e 28 semanas de gestação, descreveram área sob a curva de 0,602 para sFlt-1, de 0,638 para PIGF e de 0,622 para a razão sFlt-1/PIGF⁷⁹.

Contudo, entre os trabalhos dos diversos autores, são variados os fatores de risco para pré-eclâmpsia apresentados pelas gestantes, o que pode justificar em grande parte as variações encontradas.

Especificamente para gestantes com hipertensão arterial crônica, os resultados das avaliações dos fatores angiogênicos na predição de pré-eclâmpsia superajuntada são ainda muito escassos.

Em nossa coorte de gestantes hipertensas foi possível a predição de pré-eclâmpsia superajuntada pela dosagem dos fatores angiogênicos apenas com idade gestacional mais avançada que na coorte de gestantes normotensas, e com menores desempenhos dos testes. Como dosagem

isolada, somente a razão sFlt-1/PIGF com 32 semanas foi capaz de distinguir as gestantes que apresentariam pré-eclâmpsia superajuntada, com área sob a curva de 0,69. A avaliação dinâmica dos marcadores permitiu antecipar e aumentar a capacidade de predição, de maneira que a avaliação seriada entre 20 e 26 semanas de PIGF apresentou área sob a curva de 0,74 e da razão sFlt-1/PIGF apresentou área sob a curva de 0,71. Para esta medida, obtivemos acurácia máxima de 75%, com sensibilidade de 64% e especificidade de 86% usando como ponto de corte quedas da razão sFlt-1/PIGF menores ou iguais a 27,51% entre 20 e 26 semanas de gestação.

Sobre os trabalhos que avaliaram especificamente a predição de pré-eclâmpsia superajuntada em gestantes com hipertensão arterial crônica, Powers et al. e Maynard et al. não apresentaram análise ROC em seus resultados. No trabalho de Perni et al. apenas apontaram que a inclusão da dosagem de fatores reguladores de angiogênese em modelo com dados clínicos e laboratoriais de predição de pré-eclâmpsia, aumentou a área sob a curva de 0,764 para 0,852, sem apresentação dos dados individuais para as dosagens dos fatores angiogênicos⁸⁵⁻⁸⁷.

Nossos resultados sobre capacidade de predição de pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada apresentaram valores intermediários aos descritos por outros autores. A heterogeneidade de quadros clínicos apresentados pelas gestantes e a grande variação nos resultados das dosagens dos fatores reguladores de angiogênese dificultam o estabelecimento de pontos de corte universais para a predição de pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada.

Nosso achados apontam para a existência de diferenças tanto nas idades gestacionais como nos tipos de biomarcadores e nas suas capacidades de predição para diagnóstico de pré-eclâmpsia e de pré-eclâmpsia superajuntada, sugerindo que devam ser avaliados de formas distintas entre essas duas condições.

8 CONCLUSÕES

Para predição de pré-eclâmpsia, a dosagem isolada de PIGF apresenta bom desempenho já a partir de 20 semanas de gestação. A adição da dosagem de sFlt-1 para cálculo da razão sFlt-1/PIGF em idades gestacionais mais avançadas pode melhorar este desempenho. Já para gestantes com hipertensão arterial crônica, a predição de pré-eclâmpsia superajuntada pela dosagem isolada de sFlt-1 e PIGF só é possível mais tardiamente na gestação, pelo cálculo da razão sFlt-1/PIGF com 32 semanas. No entanto, a avaliação dinâmica pela dosagem seriada desses fatores entre 20 e 26 semanas também permite a predição da doença, porém com desempenho mais baixo que para a predição da PE “pura”.

O comportamento dos fatores reguladores de angiogênese sFlt-1 e PIGF e da razão sFlt-1/PIGF é semelhante nas gestantes normotensas e com hipertensão arterial crônica, exceto para o sFlt-1 entre 20 e 26 semanas. De um modo geral, nos dois grupos há aumento dos níveis de PIGF entre 20 e 26 semanas, quando mantêm-se estáveis até 32 semanas e então decrescem até 36 semanas. A razão sFlt-1/PIGF diminui nestes grupos entre 20 e 26 semanas, mantêm-se estável até 32 semanas e então aumenta até 36 semanas. Os níveis de sFlt-1, no entanto, mantêm-se estáveis nas gestantes normotensas até 26 semanas, quando passam a subir até 36 semanas, enquanto nas gestantes com hipertensão arterial crônica os níveis de sFlt-1 começam a aumentar mais precocemente, já a partir de 20 semanas. Por outro lado, nos grupos de gestantes com pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superajuntada, as variações dos fatores reguladores de angiogênese são mais tênues ao longo da gestação. Notadamente, a queda dos níveis de PIGF acontece mais precocemente nessas gestantes, já a partir de 26 semanas de gestação, quando comparadas às gestantes que não desenvolvem a doença.

Há diferença nos valores basais dos fatores reguladores de angiogênese entre gestantes normotensas e hipertensas crônicas, e estas últimas apresentam níveis mais baixos de sFlt-1 e de PIGF nas idades gestacionais de

20, 26 e 32 semanas. No entanto, os valores da razão sFlt-1/PIGF ao longo da gestação são semelhantes entre os grupos.

Entre as gestantes que apresentam diagnóstico de pré-eclâmpsia, os níveis de sFlt-1 são significativamente maiores naquelas que apresentam pré-eclâmpsia “pura” que naquelas com pré-eclâmpsia superajuntada nas idades gestacionais de 32 e 36 semanas, o que pode representar maior relevância do sFlt-1 na fisiopatogenia da pré-eclâmpsia em sua forma “pura” que na sua forma superajuntada, em que outros mecanismos fisiopatogênicos podem exercer maior importância.

Em conjunto, nossos resultados sugerem que os fatores reguladores de angiogênese sFlt-1 e PIGF exercem papéis distintos para a predição da pré-eclâmpsia e da pré-eclâmpsia superajuntada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lam C, Lim KH, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension*. 2005; 46:1077–85.
2. Levine RJ, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol*. 2005;48:372–86.
3. Zanette E, Parpinelli MA, Surita FG, Costa ML. Maternal near miss and death among women with severe hypertensive disorders: a Brazilian multicenter surveillance study. *Reproductive Health*. 2014;11:4.
4. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gulmezoglu AM, Van Look PF. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet*. 2006;367:1066–74.
5. Vega C, Kahhale S, Zugaib M. Maternal mortality due to arterial hypertension in São Paulo city (1995-1999). *Clinics*. 2007;62:679–84.
6. Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS [Internet]. Informações de Saúde. Estatísticas Vitais. Mortalidade e nascidos vivos: óbitos maternos. 2008 [acessado 2014 Ago 17]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/mat10uf.def>
7. Staff AC, Benton SJ, Dadelszen von P, Roberts JM, Taylor RN, Powers RW, et al. Redefining preeclampsia using placenta-derived biomarkers. *Hypertension*. 2013;61:932–42.
8. Bittar RE, Pereira PP, Liao AW, Fittipaldi FS. Doença hipertensiva específica da gestação. In: Zugaib M, editor. *Zugaib Obstetrícia*. 2a ed. Barueri: Manole; 2012. p. 633–62.
9. American College of Obstetricians and Gynecologists. Chronic Hypertension in Pregnancy. ACOG Practice Bulletin No. 125. *Obstet Gynecol*. 2012;119:396–407.
10. Gaio DS, Schmidt MI, Duncan BB, Nucci LB, Matos MC, Branchtein L. Hypertensive disorders in pregnancy: frequency and associated factors in a cohort of brazilian women. *Hypertens Pregnancy*. 2001;20:269–81.
11. Ruano R, Yoshizaki CT, Martinelli S, Pereira PP. Hipertensão arterial sistêmica. In: Zugaib M, editor. *Zugaib Obstetrícia*. 2ª ed. Barueri: Manole; 2012. p. 881–90.
12. Kahhale S, Zugaib M. Conceito, classificação e incidência das síndromes hipertensivas na gestação. In: Kahhale S, Zugaib M, editores. *Síndromes hipertensivas na gravidez*. Rio de Janeiro: Atheneu; 1995. p. 1–14.

13. American College of Obstetricians and Gynecologists. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. ACOG Practice Bulletin No. 33. *Obstet Gynecol.* 2002;99:159–67.
14. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.* 2004;350:672–83.
15. Bdolah Y, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Angiogenic imbalance in the pathophysiology of preeclampsia: Newer insights. *Semin Nephrol.* 2004;24:548–56.
16. Masuyama H, Suwaki N, Nakatsukasa H, Masumoto A, Tateishi Y, Hiramatsu Y. Circulating angiogenic factors in preeclampsia, gestational proteinuria, and preeclampsia superimposed on chronic glomerulonephritis. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194:551–6.
17. Osungbade KO, Ige OK. Public health perspectives of preeclampsia in developing countries: implication for health system strengthening. *J Pregnancy.* 2011:481095.
18. Kaur J, Kaur K. Does an Antenatal Care make a difference? *Hum Biol Rev.* 2013;2:120–35.
19. Baumwell S, Karumanchi SA. Pre-eclampsia: clinical manifestations and molecular mechanisms. *Nephron Clin Pract.* 2007;106:c72–c81.
20. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology.* 2009;24:147–58.
21. Milne F, Redman C, Walker J, Baker P, Bradley J, Cooper C, et al. The pre-eclampsia community guideline (PRECOG): how to screen for and detect onset of pre-eclampsia in the community. *BMJ.* 2005;330:576–80.
22. Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant J-F, Pignon M-R, Noel A, et al. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:5555–63.
23. Medeiros LTL, Peraçoli JC, Bannwart-Castro CF, Romão M, Weel IC, Golim MA, et al. Monocytes from pregnant women with pre-eclampsia are polarized to a M1 phenotype. *Am J Reprod Immunol.* 2014;72:5–13.
24. Cavalli RC, Sandrim VC, Santos J. Predição de pré-eclâmpsia. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009;31: 1-4.
25. Kahhale S, Zugaib M. Fisiopatologia da pré-eclâmpsia. In: Kahhale S, Zugaib M, editores. Síndromes hipertensivas na gravidez. Rio de Janeiro: Atheneu; 1995. p. 15–30.

26. McElrath TF, Lim K-H, Pare E, Rich-Edwards J, Pucci D, Troisi R, et al. Longitudinal evaluation of predictive value for preeclampsia of circulating angiogenic factors through pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;207:407.e1–7.
27. Sharkey AM, Cooper JC, Balmforth JR, McLaren J, Clark DE, Charnock-Jones DS, et al. Maternal plasma levels of vascular endothelial growth factor in normotensive pregnancies and in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Eur J Clin Invest.* 1996;26:1182–5.
28. Gant NF, Daley GL, Chand S, Whalley PJ, MacDonald PC. A Study of Angiotensin II Pressor Response throughout Primigravid Pregnancy. *J Clin Invest.* 1973;52:2682–9.
29. Kahhale S. Contribuição ao estudo do teste pressórico de Gant [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1983.
30. Galletta MAK. Estudo do teste da angiotensina II em gestantes hipertensas crônicas na predição da pré-eclâmpsia superajuntada [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1997.
31. Gant NF, Chand S, Worley RJ, Whalley PJ, Crosby UD, MacDonald PC. A clinical test useful for predicting the development of acute hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1974;120:1–7.
32. Kahhale S. Contribuição ao estudo das alterações pressóricas posicionais em gestantes com hipertensão arterial crônica: teste pressórico de Gant, teste da hipotensão em decúbito lateral [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1987.
33. Liao AW. Predição da pré-eclâmpsia pelo estudo dopplervelocimétrico endovaginal das artérias uterinas entre 11-13 e 20-24 semanas de gestação [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.
34. Polsani S, Phipps E, Jim B. Emerging new biomarkers of preeclampsia. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2013;20:271–9.
35. Poon LCY, Akolekar R, Lachmann R, Beta J, Nicolaides KH. Hypertensive disorders in pregnancy: screening by biophysical and biochemical markers at 11-13 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010; 35:662-70.
36. Myatt L, Clifton RG, Roberts JM, Spong CY, Hauth JC, Varner MW, et al. First-trimester prediction of preeclampsia in nulliparous women at low risk. *Obstet Gynecol.* 2012;119:1234–42.
37. Kuc S, Koster MPH, Franx A, Schielen PCJI, Visser GHA. Maternal characteristics, mean arterial pressure and serum markers in early

prediction of preeclampsia. *PLoS One*. 2013;8:e63546.

38. Baschat AA, Magder LS, Doyle LE, Atlas RO, Jenkins CB, Blitzer MG. Prediction of preeclampsia utilizing the first trimester screening examination. *Am J Obstet Gynecol*. In press 2014.
39. Reuvekamp A, Velsing Aarts FV, Poulina IEJ, Capello JJ, Duits AJ. Selective deficit of angiogenic growth factors characterises pregnancies complicated by pre-eclampsia. *BJOG*. 1999;106:1019–22.
40. Lemoine AY, Ledoux S, Larger E. Adipose tissue angiogenesis in obesity. *Thromb Haemost*. 2013;110:661–9.
41. Herse F, Fain JN, Janke J, Engeli S, Kuhn C, Frey N, et al. Adipose tissue-derived soluble fms-like tyrosine kinase 1 is an obesity-relevant endogenous paracrine adipokine. *Hypertension*. 2011;58:37–42.
42. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997;18:4–25.
43. Lappas M. Markers of endothelial cell dysfunction are increased in human omental adipose tissue from women with pre-existing maternal obesity and gestational diabetes. *Metabolism*. 2014;63:860–73.
44. Major HD, Campbell RA, Silver, RM, Branch DW, Weyrich AS. Synthesis of sFlt-1 by platelet-monocyte aggregates contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2014; 210:547.e1-7.
45. Suwaki N, Masuyama H, Nakatsukasa H, Masumoto A, Sumida Y, Takamoto N, et al. Hypoadiponectinemia and circulating angiogenic factors in overweight patients complicated with pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195:1687–92.
46. Rajakumar A, Michael H, Rajakumar P, Shibata E, Hubel C, Karumanchi S, et al. Extra-placental expression of vascular endothelial growth factor receptor-1, (Flt-1) and soluble Flt-1 (sFlt-1), by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in normotensive and preeclamptic pregnant women. *Placenta*. 2005;26:563–73.
47. Wu FTH, Stefanini MO, Gabhann FM, Kontos CD, Annex BH, Popel AS. A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role & therapeutic use. *J Cell Mol Med*. 2009;14:528–52.
48. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis*. 2006;9:225–30.
49. Maharaj ASR, D'Amore PA. Roles for VEGF in the adult. *Microvasc Res*. 2007;74:100–13.
50. McKeeman GC, Ardill JES, Caldwell CM, Hunter AJ, McClure N. Soluble

vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) is increased throughout gestation in patients who have preeclampsia develop. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191:1240–6.

51. Baker P, Krasnow J, Roberts JM, Yeo K. Elevated serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 1995;86:815–21.
52. Murakami Y, Kobayashi T, Omatsu K, Suzuki M, Ohashi R, Matsuura T, et al. Exogenous vascular endothelial growth factor can induce preeclampsia-like symptoms in pregnant mice. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31:307–13.
53. Hunter A, Aitkenhead M, Caldwell C, McCracken G, Wilson D, McClure N. Serum levels of vascular endothelial growth factor in preeclamptic and normotensive pregnancy. *Hypertension.* 2000;36:965–9.
54. Bosio PM, Wheeler T, Anthony F, Conroy R, O’Herlihy C, McKenna P. Maternal plasma vascular endothelial growth factor concentrations in normal and hypertensive pregnancies and their relationship to peripheral vascular resistance. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184:146–52.
55. Maynard SE, Min J-Y, Merchan J, Lim K-H, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003;111:649–58.
56. Livingston JC, Chin R, Haddad B, McKinney ET, Ahokas R, Sibai BM. Reductions of vascular endothelial growth factor and placental growth factor concentrations in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183:1554–7.
57. Staff AC, Braekke K, Harsem NK, Lyberg T, Holthe MR. Circulating concentrations of sFlt1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1) in fetal and maternal serum during pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005;122:33–9.
58. Palm M, Basu S, Larsson A, Wernroth L, Åkerud H, Axelsson O. A longitudinal study of plasma levels of soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1), placental growth factor (PlGF), sFlt1: PlGF ratio and vascular endothelial growth factor (VEGF-A) in normal pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2011;90:1244–51.
59. Dewerchin M, Carmeliet P. PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2:a011056.
60. Torry DS, Wang H-S, Wang T-H, Caudle MR, Torry RJ. Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179:1539–44.
61. Karumanchi SA, Epstein FH. Placental ischemia and soluble fms-like

- tyrosine kinase 1: Cause or consequence of preeclampsia? *Kidney Int.* 2007;71:959–61.
62. Teixeira PG, Cabral ACV, Andrade SP, Reis ZSN, da Cruz LPB, Pereira JB, et al. Placental growth factor (PlGF) is a surrogate marker in preeclamptic hypertension. *Hypertens Pregnancy.* 2008;27:65–73.
 63. Wolf M, Shah A, Lam C, Martinez A, Smirnakis KV, Epstein FH, et al. Circulating levels of the antiangiogenic marker sFlt-1 are increased in first versus second pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193:16–22.
 64. Llurba E, Sánchez O, Domínguez C, Soro G, Goya M, Alijotas-Reig J, et al. Smoking during pregnancy: changes in mid-gestation angiogenic factors in women at risk of developing preeclampsia according to uterine artery doppler findings. *Hypertens Pregnancy.* 2013;32:50–9.
 65. Bdolah Y, Palomaki GE, Yaron Y, Bdolah-Abram T, Goldman M, Levine RJ, et al. Circulating angiogenic proteins in trisomy 13. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194:239–45.
 66. Makris A, Thornton C, Thompson J, Thomson S, Martin R, Ogle R, et al. Uteroplacental ischemia results in proteinuric hypertension and elevated sFlt-1. *Kidney Int.* 2007;71:977–84.
 67. Schiettecatte J, Russcher H, Anckaert E, Mees M, Leeseer B, Tirelli AS, et al. Multicenter evaluation of the first automated Elecsys sFlt-1 and PlGF assays in normal pregnancies and preeclampsia. *Clin Biochem.* 2010;43:768–70.
 68. Sunderji S, Gaziano E, Wothe D, Rogers LC, Sibai B, Karumanchi SA, et al. Automated assays for sVEGF R1 and PlGF as an aid in the diagnosis of preterm preeclampsia: a prospective clinical study. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;202:40.e1-7.
 69. Verlohren S, Galindo A, Schlembach D, Zeisler H, Herraiz I, Moertl MG, et al. An automated method for the determination of the sFlt-1/PlGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;202:161.e1-11.
 70. Knudsen UB, Kronborg CS, Daddelsen von P, Kupfer K, Lee S-W, Vittinghus E, et al. A single rapid point-of-care placental growth factor determination as an aid in the diagnosis of preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2012;2:8–15.
 71. Leaños-Miranda A, Campos-Galicia I, Isordia-Salas I, Rivera-Leaños R, Romero-Arauz JF, Ayala-Méndez JA, et al. Changes in circulating concentrations of soluble fms-like tyrosine kinase-1 and placental growth factor measured by automated electrochemiluminescence immunoassays methods are predictors of preeclampsia. *J Hypertens.* 2012;30:2173–81.

72. Benton SJ, Hu Y, Xie F, Kupfer K, Lee SW, Magee LA, et al. Angiogenic factors as diagnostic tests for preeclampsia: a performance comparison between two commercial immunoassays. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;205:469.e1-8.
73. Chaiworapongsa T, Romero R, Savasan ZA, Kusanovic JP, Ogge G, Soto E, et al. Maternal plasma concentrations of angiogenic/anti-angiogenic factors are of prognostic value in patients presenting to the obstetrical triage area with the suspicion of preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011;24:1187–207.
74. Ohkuchi A, Hirashima C, Matsubara S, Takahashi K, Matsuda Y, Suzuki M. Threshold of soluble fms-like tyrosine kinase 1/placental growth factor ratio for the imminent onset of preeclampsia. *Hypertension.* 2011;58:859–66.
75. Kaufmann I, Rusterholz C, Hösli I, Hahn S, Lapaire O. Can detection of late-onset PE at triage by sflt-1 or PIGF be improved by the use of additional biomarkers? *Prenat Diagn.* 2012;32:1288–94.
76. Chaiworapongsa T, Romero R, Korzeniewski SJ, Kusanovic JP, Soto E, Lam J, et al. Maternal plasma concentrations of angiogenic/antiangiogenic factors in the third trimester of pregnancy to identify the patient at risk for stillbirth at or near term and severe late preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2013;208:287.e1-15.
77. Ghosh SK, Raheja S, Tuli A, Raghunandan C, Agarwal S. Is serum placental growth factor more effective as a biomarker in predicting early onset preeclampsia in early second trimester than in first trimester of pregnancy? *Arch Gynecol Obstet.* 2012;287:865–73.
78. Simas TA, Crawford SL, Solitro MJ, Frost SC, Meyer BA, Maynard SE. Angiogenic factors for the prediction of preeclampsia in high-risk women. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197:244.e1–8.
79. Sibai BM, Koch MA, Freire S, Pinto e Silva JL, Rudge MVC, Martins-Costa S, et al. Serum inhibin A and angiogenic factor levels in pregnancies with previous preeclampsia and/or chronic hypertension: are they useful markers for prediction of subsequent preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol.* 2008;199:268.e1-9.
80. Dwyer BK, Krieg S, Balise R, Carroll IR, Chueh J, Nayak N, et al. Variable expression of soluble fms-like tyrosine kinase 1 in patients at high risk for preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010;23:705–11.
81. Shaker OG, Shehata H. Early prediction of preeclampsia in high-risk women. *J Womens Health.* 2011;20:539–44.
82. Teixeira PG, Reis ZSN, Andrade SP, Rezende CA, Lage EM, Velloso EP, et al. Presymptomatic prediction of preeclampsia with angiogenic

- factors in high risk pregnant women. *Hypertens Pregnancy*. 2013;32:312–20.
83. Simas TA, Crawford SL, Bathgate S, Yan J, Robidoux L, Moore M, et al. Angiogenic biomarkers for prediction of early preeclampsia onset in high-risk women. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014;27:1038–48.
 84. Schoofs K, Grittner U, Engels T, Pape J, Denk B, Henrich W, et al. The importance of repeated measurements of the sFlt-1/PIGF ratio for the prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *J Perinat Med*. 2014;42:61–8.
 85. Powers RW, Jeyabalan A, Clifton RG, Van Dorsten P, Hauth JC, Klebanoff MA, et al. Soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1), endoglin and placental growth factor (PIGF) in preeclampsia among high risk pregnancies. *PLoS One*. 2010;5:e13263.
 86. Perni U, Sison C, Sharma V, Helseth G, Hawfield A, Suthanthiran M, et al. Angiogenic factors in superimposed preeclampsia: a longitudinal study of women with chronic hypertension during pregnancy. *Hypertension*. 2012;59:740–6.
 87. Maynard SE, Crawford SL, Bathgate S, Yan J. Gestational angiogenic biomarker patterns in high risk preeclampsia groups. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;209:53.e1–9.
 88. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care*. 2010;33:676–82.
 89. Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Moertl M, Zeisler H, et al. The sFlt-1/PIGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;206:58.e1–8.
 90. Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de hipertensão. *Arq. Bras. Cardiol*. 2010;95:1–51.
 91. Bryson CL, Ioannou GN, Rulyak SJ, Critchlow C. Association between gestational diabetes and pregnancy-induced hypertension. *Am J Epidemiol*. 2003;158:1148–53.
 92. Silasi M, Cohen B, Karumanchi SA, Rana S. Abnormal placentation, angiogenic factors, and the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Clin N Am*. 2010;37:239–53.
 93. Rana S, Powe CE, Salahuddin S, Verlohren S, Perschel FH, Levine RJ, et al. Angiogenic factors and the risk of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. *Circulation*. 2012;125:911–9.

94. Noori M, Donald AE, Angelakopoulou A, Hingorani AD, Williams DJ. Prospective study of placental angiogenic factors and maternal vascular function before and after preeclampsia and gestational hypertension. *Circulation*. 2010;122:478–87.
95. Akolekar R, de Cruz J, Foidart J-M, Munaut C, Nicolaides KH. Maternal plasma soluble fms-like tyrosine kinase-1 and free vascular endothelial growth factor at 11 to 13 weeks of gestation in preeclampsia. *Prenat Diagn*. 2010;30:191-7.
96. Moore AG, Young H, Keller JM, Ojo LR, Yan J, Simas TAM, et al. Angiogenic biomarkers for prediction of maternal and neonatal complications in suspected preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012;25:2651–7.
97. De Oliveira L, Peraçoli JC, Peraçoli MT, Korkes H, Zampieri G, Moron AF, et al. sFlt-1/PIGF ratio as a prognostic marker of adverse outcomes in women with early-onset preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2013;3:191–5.
98. Powers RW, Roberts JM, Plymire DA, Pucci D, Datwyler SA, Laird DM, et al. Low placental growth factor across pregnancy identifies a subset of women with preterm preeclampsia: type 1 versus type 2 preeclampsia? *Hypertension*. 2012;60:239–46.
99. Rana S, Karumanchi SA, Lindheimer MD. Angiogenic factors in diagnosis, management, and research in preeclampsia. *Hypertension*. 2014;63:198–202.
100. Levine RJ, Qian C, Maynard SE, Yu KF, Epstein FH, Karumanchi SA. Serum sFlt1 concentration during preeclampsia and mid trimester blood pressure in healthy nulliparous women. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194:1034–41.
101. Ness RB, Roberts JM. Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: A hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;175:1365–70.
102. Ness RB, Sibai BM. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195:40–9.
103. Thadhani R, Kisner T, Hagmann H, Bossung V, Noack S, Schaarschmidt W, et al. Pilot study of extracorporeal removal of soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Circulation*. 2011;124:940–50.