

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

Karen Hettfleisch Faria

**Avaliação da exposição individual à poluição atmosférica e sua
associação com marcadores angiogênicos placentários no
primeiro trimestre da gestação**

Versão original



São Paulo

2023

Karen Hettfleisch Faria

**Avaliação da exposição individual à poluição atmosférica e sua
associação com marcadores angiogênicos placentários no
primeiro trimestre da gestação**

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. Lisandra Stein Bernardes
Ciampi de Andrade

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Faria, Karen Hettfleisch

Avaliação da exposição individual à poluição atmosférica e sua associação com marcadores angiogênicos placentários no primeiro trimestre da gestação / Karen Hettfleisch Faria. -- São Paulo, 2023.

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

Programa de Obstetria e Ginecologia.

Orientadora: Lisandra Stein Bernardes Ciampi de Andrade.

Descritores: 1.Placenta 2.Fatores angiogênicos e antiangiogênicos placentários 3.Poluição atmosférica 4.Fator de crescimento placentário (PlGF) 5.Tirosina quinase 1 tipo fms solúvel (sFlt1) 6.Primeiro trimestre

USP/FM/DBD-072/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

“Eu sei que não sou nada e que talvez nunca tenha tudo. À parte isso, eu tenho em mim todos os sonhos do mundo.”

Fernando Pessoa

Dedicatória

A Deus, por tudo em minha vida.

Aos meus queridos pais, Sigfrid e Meire, a quem devo minha vida; os responsáveis pelo meu caráter, pela minha formação, pela minha educação com amor incondicional, carinho e propósito, a base de sustentação em tudo, e que possibilitaram a realização dos meus sonhos.

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

Ao meu marido Nelson, pelo companheirismo, pelo incentivo e apoio na busca dos meus projetos, pela paciência, pelo amor, possibilitando a conclusão desse sonho. Obrigada pela vida juntos.

Aos meus filhos, Laís e Thomas, por me escolherem como mãe, por me ensinarem o amor incondicional, vocês são a razão da minha vida, o brilho dos seus olhos e seus sorrisos são a fonte de luz para todos os meus sonhos e planos. Obrigada por compreenderem meus momentos de ausência.

Agradecimientos

À minha querida orientadora Profa. Dra. Lisandra Stein Bernardes Ciampi de Andrade, que sempre ensinou com muito amor e competência, que sempre acreditou e fez esse projeto e esse sonho se concretizarem. Muito obrigada pelos ensinamentos, dedicação e paciência em Medicina Fetal e na pesquisa.

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

À Profa. Dra. Rossana Pulcineli Vieira Francisco, pela idealização, organização e condução do projeto PROCRIAR.

À Profa. Dra. Alessandra Cristina Marcolin e Dra. Glúcia Rosana Guerra Benute, pela disponibilidade em participar da banca de qualificação, pelos comentários, sugestões e contribuições fundamentais para o aprimoramento da dissertação.

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

Ao Prof. Dr. Paulo H. N. Saldiva pelas reuniões com excelentes discussões sobre poluição e o projeto, com contribuições fundamentais para o meu conhecimento na área e desenvolvimento da tese de mestrado e de doutorado. Obrigada pela disponibilidade do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sem ele os amostradores passivos e todo o Projeto Procriar não seria possível.

À Mara Sandra Hoshida pela disponibilidade e trabalho em conjunto na análise dos fatores angiogênicos no Laboratório de Fisiologia Obstétrica do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

À grande amiga Mariana Azevedo Carvalho, com quem cresci junto como médica, fetóloga, pesquisadora e como ser humano, uma companhia que tive a honra de conviver e aprender. E muito obrigada pela disponibilidade de estar na banca de qualificação e as essenciais considerações.

À grande amiga Bruna Maria L. Barbosa, pela amizade verdadeira, pelo incentivo e convivência dentro e fora dos ambulatórios, a qual permanece cada dia mais valiosa.

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

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

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

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

À Sra. Lucinda Cristina Pereira, pela dedicação e todo apoio com carinho na pós-graduação, e à Sra. Cláudia Vieira por todo auxílio na fase final de depósito.

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

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

Às gestantes voluntárias pela disponibilidade, vontade e gentileza em participar deste projeto, vocês são a razão dos meus estudos e o desejo de sempre fazer o melhor em minha jornada médica.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 | OBJETIVOS | 9 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA | |
| | 3.1 Placentação e a vascularização placentária..... | 10 |
| | 3.2 Poluição e as alterações placentárias..... | 15 |
| | 3.3 Poluição atmosférica e os fatores reguladores da angiogênese placentária..... | 20 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | |
| | 4.1 Desenho do estudo..... | 24 |
| | 4.2 Seleção e seguimento das pacientes | |
| | 4.2.1 Critérios de inclusão..... | 25 |
| | 4.2.2 Critérios de exclusão..... | 25 |
| | 4.3 Recrutamento e dinâmica do projeto..... | 26 |
| | 4.4 Métodos | |
| | 4.4.1 Coleta de dados..... | 28 |
| | 4.4.2 Instrumento da coleta de dados | |
| | 4.4.2.1 Amostradores passivos Individuais de NO ₂ e O ₃ | 28 |
| | 4.4.2.2 Princípio do método de coleta e dosagem do PIGF e sFlt1..... | 33 |
| | 4.5 Análise estatística | 34 |
| 5 | RESULTADOS | |
| | 5.1 Resultados gerais..... | 37 |
| | 5.2 Análise estatística | 38 |
| 6 | DISCUSSÃO | 50 |
| 7 | CONCLUSÕES | 58 |
| 8 | ANEXOS | 59 |
| 9 | REFERÊNCIAS | 66 |

Listas

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

| | |
|-------------------|--|
| API | Amostrador passivo individual |
| CCN | Comprimento Cabeça-Nádega |
| CETESB | Companhia Ambiental do Estado de São Paulo |
| CO | Monóxido de carbono |
| DP | Desvio padrão |
| <i>et al.</i> | e colaboradores |
| FGF | <i>Fibroblast Growth Factor</i> (fator de crescimento de fibroblastos) |
| FIH | fator induzido por hipóxia |
| FMUSP | Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo |
| HCFMUSP | Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo |
| IC 95% | Intervalo de confiança de 95% |
| IG | Idade Gestacional |
| IMC | Índice de massa corporal |
| INAIRA | Instituto Nacional de Análise Integrada de Risco Ambiental |
| IV | Índice de Vascularização |
| IVF | Índice de Vascularização e Fluxo |
| Log | Logaritmo |
| LPAE | Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental |
| MP | Material particulado |
| MP ₁₀ | Material particulado com tamanho menor que 10 µm |
| MP _{2,5} | Material particulado com tamanho menor que 2,5 µm |
| MP _{0,1} | Material particulado com tamanho menor que 0,1 µm |
| N | Número de casos |
| NO | Óxido nítrico |
| NO _x | Óxido de azoto |
| NO ₂ | Dióxido de Nitrogênio |
| O ₃ | Ozônio |
| SO ₂ | Dióxido de enxofre |
| p | nível de significância |
| PE | Pré-eclâmpsia |
| PIGF | <i>Placental Growth Factor</i> (fator de crescimento placentário) |
| RCF | Restrição de Crescimento Fetal |
| sFlt1 | <i>Soluble fms-like tyrosine kinase-1</i> (tirosina quinase fms solúvel tipo1) |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| UBS | Unidade básica de saúde |
| VEGF | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (fator de crescimento vascular endotelial) |
| VEGFR | <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i> |

<
%

Menor
Porcento

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Logo do projeto ProcriAR..... | 23 |
| Figura 2 | Dinâmica do projeto ProcriAR..... | 27 |
| Figura 3 | Filtros de celulose..... | 28 |
| Figura 4 | Amostrador passivo individual pronto para ser embalado..... | 30 |
| Figura 5 | Instruções para uso do amostrador passivo individual..... | 31 |
| Figura 6 | Comparação visual entre os filtros de dióxido de nitrogênio antes e após a exposição. Filtros não danificados..... | 32 |
| Figura 7 | Comparação visual entre os filtros de ozônio antes e após a exposição. Filtros não danificados..... | 33 |
| Figura 8 | Fluxograma de pacientes no primeiro trimestre..... | 38 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1 | Características descritivas dos dados maternos, fatores reguladores de angiogênese placentária e poluentes coletados no primeiro trimestre (n=131)..... | 39 |
| Tabela 2 | Coeficiente de correlação de Spearman entre os fatores reguladores de angiogênese placentária do primeiro trimestre e a idade gestacional..... | 40 |
| Tabela 3 | Coeficiente de correlação de Spearman entre os fatores reguladores de angiogênese placentária e o IMC no primeiro trimestre..... | 41 |
| Tabela 4 | Coeficiente de correlação de Spearman entre os fatores reguladores de angiogênese placentária do primeiro trimestre e a idade materna..... | 41 |
| Tabela 5 | Coeficiente de correlação de Spearman entre os poluentes dosados no primeiro trimestre..... | 42 |
| Tabela 6 | Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis fatores reguladores de angiogênese placentária e a exposição aos poluentes no primeiro trimestre..... | 42 |
| Tabela 7 | Apresentação das médias e desvio-padrão do logaritmo dos fatores reguladores de angiogênese placentária em gestantes tabagistas e não-tabagistas no primeiro trimestre... | 43 |
| Tabela 8 | Apresentação das médias e desvio-padrão do logaritmo dos fatores reguladores de angiogênese placentária em gestantes nulíparas e múltiparas no primeiro trimestre..... | 44 |
| Tabela 9 | Apresentação das médias e desvio-padrão do logaritmo dos fatores reguladores de angiogênese placentária em gestantes brancas e não-brancas no primeiro trimestre..... | 44 |
| Tabela 10 | Estimativas dos coeficientes e valores de p dos modelos de regressão linear múltipla no primeiro trimestre..... | 46 |
| Tabela 11 | Estimativas dos coeficientes e valores de p dos modelos finais de regressão linear múltipla no primeiro trimestre..... | 48 |

Resumo

Hettfleisch, K. Avaliação da exposição individual à poluição atmosférica e sua associação com marcadores angiogênicos placentários no primeiro trimestre da gestação [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

OBJETIVOS: Avaliar os efeitos da exposição individual materna à poluição atmosférica nas concentrações séricas maternas de fator de crescimento placentário (PIGF) e tirosina quinase fms solúvel tipo 1 (sFlt1), assim como na relação sFlt1/PIGF, no primeiro trimestre de gravidez. **MÉTODOS:** Este estudo é uma coorte prospectiva, realizada entre outubro de 2011 e março de 2014, com gestantes de baixo risco residentes em São Paulo (Brasil). Os critérios de inclusão foram feto único, idade gestacional entre 11 e 13 semanas e 6 dias, ausência de patologias maternas, ausência de malformações fetais e o uso correto do amostrador passivo individual dos poluentes NO₂ e O₃. Os critérios de exclusão foram gestação gemelar, aborto e malformações diagnosticadas à ultrassonografia, mudança de endereço para fora da área de recrutamento, desistência da paciente e doença materna diagnosticada durante o seguimento. As gestantes carregavam os amostradores passivos individuais de NO₂ e O₃ entre 7 e 18 dias antes da avaliação na Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (FMUSP), onde entregavam o amostrador e eram submetidas à coleta de amostras de sangue venoso para dosagem dos fatores reguladores de angiogênese placentária PIGF e sFlt1 e sua razão (sFlt1/PIGF), pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). A influência dos poluentes estudados nas concentrações log-transformadas dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos que foram avaliados por meio de modelos de regressão linear múltipla, controlados para idade gestacional, índice de massa corporal, idade materna, tabagismo, etnia materna e paridade. **RESULTADOS:** Foram avaliadas 131 gestantes no primeiro trimestre. Observou-se que a razão sFlt1/PIGF aumentou com a exposição a níveis mais altos de NO₂ ($p=0.009$ e $\beta=0.225$), e a concentração de PIGF teve uma associação negativa com NO₂ ($p=0.003$ e $\beta=-0.257$). No entanto, a exposição ao O₃ teve associação positiva com a concentração de PIGF ($p=0.023$ e $\beta=0.194$) e negativa com a razão sFlt1/PIGF ($p=0.036$ e $\beta=-0.181$). Ambos os poluentes não apresentaram influência sobre os níveis de concentração de sFlt1. **CONCLUSÃO:** O poluente NO₂, um indicador dos níveis de poluentes atmosféricos primários, foi significativamente associado a um aumento da razão sFlt1/PIGF e à diminuição dos níveis de PIGF no primeiro trimestre de gestação, o que pode refletir um estado antiangiogênico gerado pela exposição à poluição atmosférica, apesar dos resultados positivos do efeito do ozônio.

Palavras-chave: Placenta, Fatores angiogênicos e antiangiogênicos placentários, Poluição atmosférica, Fator de crescimento placentário (PIGF), Tirosina quinase 1 tipo fms solúvel (sFlt1), Primeiro trimestre.

Abstract

Hettfleisch, K. Evaluation of individual exposure to urban air pollution and its association with placental angiogenic markers in the first trimester of pregnancy [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

OBJECTIVES: To evaluate the effects of individual maternal short-term exposure to air pollution on maternal blood concentrations of placental growth factor (PIGF) and soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt1), and their ratio (sFlt1/PIGF), in the first trimester of pregnancy. **METHODS:** This study is a prospective cohort, conducted from October 2011 to March 2014, with low-risk pregnant women living in São Paulo, Brazil. The inclusion criteria were single fetus, gestational age between 11 weeks and 13 weeks and 6 days, the absence of maternal disease, fetal defects and correct use of passive personal monitors pollutants. The exclusion criteria were twin pregnancy, abortion and malformations diagnosed on ultrasound, change of address out of the area of recruitment, patient abandonment, and maternal disease diagnosed during follow-up. The pregnant women carried the passive personal monitors pollutants of NO₂ and O₃ for 7 to 18 days before the evaluation at the Obstetrical Clinic of the Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de São Paulo (FMUSP), where they delivered the filter and their venous blood samples was collected for measurement of the angiogenic and anti-angiogenic factors PIGF and sFlt1 and their ratio (sFlt1/PIGF), by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The effect of the studied pollutants on the log-transformed concentrations of the angiogenic and anti-angiogenic factors were evaluated using multiple linear regression models, controlled for gestational age, body mass index, mother age, smoking status, maternal ethnicity and parity. **RESULTS:** One hundred thirty-one patients were evaluated in the first trimester. We observed that the sFlt1/PIGF ratio increased with exposure to higher levels of NO₂ ($p=0.009$ and $\beta=0.225$), and the PIGF concentration had a negative association with NO₂ ($p=0.003$ and $\beta=-0.257$). However, O₃ exposure had a positive association with the PIGF concentration ($p=0.023$ and $\beta=0.194$) and negative with the sFlt1/PIGF ratio ($p=0.036$ and $\beta=-0.181$). Both pollutants had no influence on levels of sFlt1 concentration. **CONCLUSION:** NO₂, an indicator of the levels of primary air pollutants, was significantly associated with an increased sFlt1/PIGF ratio and diminished PIGF levels in the first trimester of pregnancy, which may reflect an antiangiogenic state generated by air pollution exposure, despite the positive effect of ozone.

Keywords: Placenta; Placental angiogenic factors; Air pollution; Placental growth factor (PIGF); Soluble fms-type tyrosine kinase-1 (sFlt1); First trimester.

Introdução

1 – INTRODUÇÃO

A poluição do ar é sabidamente causadora de inúmeros malefícios à saúde humana, sendo responsável por óbitos prematuros, hospitalizações e dias de licença médica, sendo estas associações já demonstradas há décadas, tanto em estudos epidemiológicos como experimentais, tornando-se um grande problema de saúde pública em todos os grupos etários no mundo, incluindo as mulheres grávidas, uma população, especialmente, vulnerável aos impactos adversos da poluição do ar (1-9). A poluição atmosférica pode ser definida, como a presença de substâncias impróprias na atmosfera, estejam elas nos estados gasoso, sólido ou líquido em suspensão, resultantes da atividade humana ou de ações naturais, em concentrações que as tornam agressivas e nocivas, sendo capazes de interferir direta ou indiretamente na saúde, segurança e bem-estar dos seres vivos, causando-lhes danos (10-12). As concentrações dos poluentes são conseqüências de diferentes e complexas interações que abrangem a quantidade e a forma de sua emissão, transporte, capacidade de dispersão, transformações químicas e deposição, sendo as condições climáticas e meteorológicas importantes definidoras e influenciadoras de tais processos (7).

Os poluentes podem ser classificados de várias formas, são primários ou secundários, dependendo do modo como são produzidos, internos ou externos, de acordo com o local de produção e dispersão, antropogênicos ou naturais, a depender da fonte de sua produção, e gasosos ou particulados, conforme suas

características físicas (10, 11, 13). Os poluentes primários são emitidos diretamente na atmosfera, e por meio de reações químicas e fotoquímicas originam os poluentes secundários. Atualmente, a principal fonte antropogênica da poluição atmosférica é a queima de combustíveis fósseis nos motores à combustão, seja em indústrias ou em veículos automotivos, presentes nas grandes capitais do mundo, incluindo a cidade de São Paulo (10, 11, 13).

O material particulado (MP), eleito como o poluente a ser dosado em muitos estudos, é constituído de diversas substâncias químicas e partículas em suspensão, como nitratos, sulfatos, compostos orgânicos, poeira e metais pesados, apresenta uma classificação de acordo com o diâmetro aerodinâmico das partículas, sendo o MP grosseiro de 2,5 a 10 μm , o fino ou $\text{MP}_{2,5}$ de 0,1 a 2,5 μm , e o ultrafino ou $\text{MP}_{0,1}$ menor que 0,1 μm . Estas subdivisões podem ser agrupadas no chamado MP_{10} , ou seja, todo material particulado com diâmetro menor que 10 μm , que tem a propriedade de ser inalável e chegar até às vias aéreas inferiores e, ainda, podendo carregar gases adsorvidos em sua superfície (1-5, 10, 11, 14)

Os principais poluentes gasosos são o monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrogênio (NO_2), dióxido de enxofre (SO_2), ozônio (O_3) e os compostos orgânicos voláteis (COV). Os óxidos de azoto (NO_x) são provenientes predominantemente da frota veicular e queima industrial de derivados do petróleo, além de usinas termoelétricas; em ambiente intradomiciliar são produzidos em fogões à lenha e querosene, e aquecedores que empregam querosene e fumaça de cigarro (11). O óxido nítrico (NO) é gerado por meio de reações de combustão, e na atmosfera é oxidado em NO_2 . Este é considerado tóxico em razão de propriedade oxidante e

produtor de radicais livres (10, 13). O ozônio é um poluente secundário formado a partir dos óxidos de azoto e hidrocarbonetos na presença de radiação solar e calor, reações químicas e fotoquímicas que ocorrem na troposfera (camada da atmosfera mais próxima da crosta terrestre). Seu potencial tóxico é prejudicial à saúde humana, também é proveniente de sua atividade oxidativa e citotóxica. Tanto o NO₂ como o O₃, e até mesmo o MP, atingem as porções mais distais das vias aéreas, assim sendo viável serem transportados aos demais sistemas do corpo humano, entre eles, a placenta quando há a gestação (10, 11, 15, 16).

Os efeitos tóxicos de um poluente dependem, além de sua concentração no ar atmosférico, primordialmente do tempo de exposição que um indivíduo permanece em contato com esses poluentes, e essa variável altera-se nos diversos ambientes, seja no trabalho, na residência, em áreas de lazer e, até mesmo, no transporte entre eles, já que congestionamentos agravam a emissão de poluentes (11, 17-19).

A fim de se quantificar as concentrações de poluentes atmosféricos existem as estações fixas de monitoramento do ar, que abrangem uma determinada área a seu redor, permitem medir diferentes poluentes ao mesmo tempo, além de serem utilizadas em grandes estudos populacionais (20). Apesar de seu imensurável valor, elas não possibilitam avaliar as variações de exposição específicas de cada indivíduo, de acordo com sua mobilidade e, portanto, sua real exposição à poluição atmosférica (19).

Essa vigilância precisa e necessária tornou-se possível com o desenvolvimento dos amostradores passivos individuais (API), que permanecem

com o indivíduo em todos os ambientes nos quais ele esteja, e, portanto, permitem até mesmo a quantificação da poluição dos ambientes internos. Além de apresentarem as seguintes vantagens: ser um método de baixo custo, de simples utilização, não alterar a rotina individual, não há a necessidade do uso de bateria ou outros dispositivos (15, 21).

Na literatura, há inúmeras publicações que evidenciam os efeitos nocivos da poluição atmosférica sobre os diversos sistemas do corpo humano, estando associada ao câncer de pulmão, asma, doenças cardiológicas e neurológicas (1, 2, 22-24), como também a complicações no período gestacional que podem levar a desfechos obstétricos adversos, tais como pré-eclâmpsia (PE), hipertensão gestacional, restrição de crescimento fetal (RCF), redução de circunferência cefálica, hipóxia fetal, descolamento prematuro de placenta e óbito (25-44). Estas complicações maternas e fetais vêm sendo pesquisadas e relatadas, como consequências dos efeitos da poluição atmosférica sobre a função e crescimento da placenta (34, 45-52). A placenta forma a interface entre a circulação fetal e materna e, portanto, desempenha função crítica ao desenvolvimento e crescimento do feto, já que funciona como pulmões, rins, intestinos, sendo responsável pelas trocas gasosas e de nutrientes entre a mãe e o feto, remove os catabólitos fetais, além de apresentar capacidade endócrina, secretando substâncias como a progesterona, estrogênio, gonadotrofina coriônica e hormônio lactogênio placentário (53-55). Ao mesmo tempo, sua função imunológica é primordial, pois permite que os anticorpos da classe IgG alcancem o feto e funciona como uma

barreira, a fim de impedir que diversos organismos patogênicos cheguem até a circulação fetal (55).

São poucos os estudos sobre os possíveis mecanismos subjacentes que podem vincular os resultados adversos na gravidez à exposição materna e à poluição do ar. Contudo tem sido demonstrado que poluentes podem ter ação desencadeando lesão hipóxico-isquêmica da placenta, pela indução de estresse oxidativo e inflamação sistêmica, disfunção endotelial, alterações no hematócrito, viscosidade sanguínea, coagulação e respostas hemodinâmicas, assim gerando inflamação placentária e prejudicando o processo da placentação, vascularização, por consequência, seu crescimento e função, assim como pelas alterações do DNA, sejam elas em seu imprinting ou epigenéticas, como a metilação de genes da placenta que estão associados à hipoxia e desenvolvimento de distúrbios hipertensivos e metabólicos (1, 45, 47, 48, 56-63). Deste modo, sugere-se que as complicações acima descritas, provenientes da poluição atmosférica, têm seu início na placentação anormal, que seria caracterizada por invasão trofoblástica deficiente e falta de modificação das artérias espiraladas, e, portanto, comprometendo a vascularização placentária (47, 61, 64-67). A função da placenta depende primordialmente destes dois processos, dessa forma, acaba sendo lesada, como resultado da interação entre os poluentes e a placentação (45, 56, 57).

O desenvolvimento da placenta ocorre sobretudo por meio de dois processos: angiogênese e vasculogênese (68). O fator de crescimento placentário (PIGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) são os principais fatores pró-angiogênicos responsáveis pelo crescimento placentário, enquanto a tirosina

quinase fms solúvel tipo 1 (sFlt1) (do inglês *soluble fms-like tyrosine 1*) é um fator antiangiogênico. O trofoblasto, as células endoteliais e os monócitos sintetizam sFlt1, e esta proteína liga-se aos fatores pró-angiogênicos, impedindo dessa forma sua ação angiogênica (69-71). O VEGF, produzido sobretudo no citotrofoblasto dos vilos, tem sua produção estimulada em regime de hipóxia, como ocorre no início da placentação. O PlGF pode ser produzido por células endoteliais e citosinciciotrofoblastos, porém tem regulação negativa em resposta à redução da tensão de oxigênio, como na placenta primitiva, e sua concentração vai aumentando no decorrer da gestação, com o aumento exponencial do fluxo sanguíneo placentário e, portanto, de sua oxigenação (69, 72). O PlGF, ao se ligar ao receptor de VEGF1, promove a proliferação, migração e ativação de células endoteliais. Contudo, quando o PlGF está ligado ao sFlt1, sua concentração livre diminui na circulação, e, portanto, sua ação angiogênica sobre a vascularização da placenta fica prejudicada e reduzida (71). Portanto, um desequilíbrio na concentração placentária de fatores pró e antiangiogênicos vem sendo associada ao processo patológico de disfunção placentária em gestações, nas quais ocorrem o desenvolvimento de pré-eclâmpsia, hipertensão gestacional e RCF (73-75).

Conseqüentemente, vem se pesquisando de forma intensa marcadores que possam avaliar indiretamente a vascularização placentária, sobretudo de conhecidos fatores vasculares que participam da angiogênese da placenta. Primordialmente pelos estudos com pré-eclâmpsia, na qual há sabidamente deficiência da vascularização placentária, assim como na restrição de crescimento fetal, foram encontrados dois importantes fatores reguladores da angiogênese da

placenta que podem ser mensurados no sangue materno, sendo eles o PIGF, um fator angiogênico placentário, e o sFlt1, um fator anti-angiogênico, que se encontram em concentrações séricas alteradas nas pacientes que desenvolvem tais comorbidades durante a gestação. Tais fatores foram amplamente pesquisados nas gestantes e já está corroborado o uso das concentrações séricas do PIGF e sFlt1 para estimar o risco desses distúrbios da gravidez, como a diminuição no PIGF no primeiro trimestre (76-78), assim como a relação entre eles (razão sFlt1/PIGF), que demonstrou, nos segundo e terceiro trimestres um desempenho superior ao PIGF ou sFlt1 isoladamente na predição e diagnóstico de PE (73, 74, 79, 80).

Conforme explicitado acima, há evidências de que a poluição atmosférica está relacionada a tais complicações obstétricas; entretanto, poucos estudos pesquisaram se há relação entre níveis de exposição à poluição do ar e à concentração dos fatores reguladores da angiogênese placentária, sobretudo no primeiro trimestre. Em um importante estudo realizado por Van den Hooden et al., usando técnicas de modelagem de dispersão para estimar NO_2 e MP_{10} , chegou-se à conclusão de que a quantidade de fatores angiogênicos pode ter uma associação significativa com a poluição do ar, levando à angiogênese placentária prejudicada, uma vez que foram detectados no sangue do cordão fetal correlação de níveis mais elevados de sFlt1 e níveis mais baixos de PIGF com exposições médias mais altas a NO_2 e MP_{10} (56). Esta condição fetal pode refletir um estado antiangiogênico materno.

Além disso, não há estudos que avaliem esses fatores angiogênicos e antiangiogênicos em gestantes usuárias de dispositivos pessoais passivos para

quantificar os poluentes atmosféricos, que é o método mais confiável e adequado para estimar o real contato delas com determinados agentes de poluição do ar (81).

Dessa forma, há a hipótese de que a elevada exposição à poluição atmosférica poderia alterar as concentrações séricas maternas de fatores reguladores da angiogênese placentária, sobretudo nos estágios iniciais da gestação, e como consequência afetar o desenvolvimento fisiológico da gravidez, gerando patologias materno-fetais, como a PE e a RCF. Portanto, esta pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de examinar os resultados da exposição individual a gases poluentes da atmosfera, o NO_2 e O_3 , sobre as concentrações sanguíneas maternas de PIGF e sFlt1 durante o primeiro trimestre de gestação em mulheres grávidas de baixo risco, na cidade de São Paulo, local com altos níveis de poluição urbana.

Objetivos

2 – OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo: avaliar os efeitos da exposição individual materna aos poluentes atmosféricos, NO₂ e O₃, sobre as concentrações séricas dos fatores reguladores de angiogênese placentária, PIGF e sFlt1, assim como na relação entre eles, sFlt1/PIGF, em gestantes de baixo risco, no primeiro trimestre.

Revisão de Literatura

3 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 – Placentação e a vascularização placentária

A placentação inicia-se quando o endométrio recebe o blastocisto, entre os sexto e o décimo primeiro dia após a concepção, ocorrendo sua implantação e diferenciação em tecidos embrionários e extra-embrionários (54). Esse processo depende, necessariamente, do trofoblasto, o primeiro tipo de célula a se diferenciar do ovo fertilizado e sua divisão em duas camadas: o sinciciotrofoblasto e o citotrofoblasto, o conjunto de células mais externo e interno, respectivamente, sendo as funções placentárias já iniciadas por volta da quarta semana de gestação, quando as conexões anatômicas já estão estabelecidas.

A vascularização placentária ocorre por meio de dois processos responsáveis pela formação da rede vascular nos vilos coriônicos: a vasculogênese e a angiogênese, que são consecutivos e minuciosamente regulados e coordenados pela inibição e indução dos fatores angiogênicos. O desenvolvimento da vascularização placentária é primordial para o funcionamento adequado deste órgão, e conseqüentemente, para a evolução natural da gestação. Os principais agentes que promovem tais processos são o regime de hipóxia local, que estimula a proliferação e a diferenciação do trofoblasto por meio de diversos fatores angiogênicos produzidos localmente (72, 82). Dentre estes, podemos destacar o papel da família do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que inclui o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o fator de crescimento placentário 1 e 2

(PlGF-1 e 2), além de seus receptores: VEGF *receptor-1* (VEGFR-1) ou *fms-like tyrosine kinase* (Flt-1), VEGF *receptor-2* (VEGFR-2, Flk-1/KDR), VEGF *receptor-3* (VEGFR-3/Flt-4). Outros fatores envolvidos são o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e angiopoeitina 1 e 2 e seus receptores Tie-1 e Tie-2 (68, 72, 83, 84).

O VEGF é fortemente expresso sobretudo no citotrofoblasto dos vilos, além disso nas células hemangiogênicas, células de Hofbauer (macrófagos do estroma viloso, com origem mesenquimal) e nos pericitos; seus receptores têm expressão nas células precursoras vasculogênicas e angiogênicas e, subsequentemente, nas células endoteliais (85). O VEGF é um potente estimulador de mitose de células endoteliais, altamente específico, induzindo sua diferenciação, proliferação e migração, além de inibir a apoptose (68, 83). Por conseguinte, desempenha papel central na regulação da vasculogênese e induz a angiogênese, sendo sua produção estimulada por baixas tensões de oxigênio, característica da placenta primitiva (72, 84, 86). O PlGF está presente no trofoblasto e nas células endoteliais dos núcleos vilosos, controla o crescimento e diferenciação do trofoblasto, e, em sinergismo com o VEGF ao potencializar seus efeitos, participa do crescimento da rede vascular angiogênica, tendo como fundamental receptor o VEGFR-1 ou Flt-1 (70). Mas, ao contrário do VEGF, o regime de hipóxia tem efeito negativo em sua produção, que aumenta substancialmente no segundo trimestre de gestação, fase de grande ampliação do fluxo sanguíneo placentário e, portanto, de maior oxigenação (69, 72).

A vasculogênese consiste na formação dos primeiros vasos sanguíneos pelo processo de diferenciação de células mesenquimais pluripotentes em células

hemangiogênicas, ou seja, na concepção dos capilares primitivos, do VEGF e de seus receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 (68, 69). Ela inicia-se em torno do 21º dia pós-concepção, no viló mesenquimal (o viló mais primitivo), formado após a invasão do tecido mesenquimal no viló trofoblástico primário (69). Dessa forma, podemos relatar que a placentação, inicialmente, é resultado de vasos de novo no viló placentário mesenquimal, ao invés de protusão de vasos embrionários na placenta, não depende de células precursoras endoteliais circulantes e das endoteliais maduras, já que ela ocorre na ausência do endotélio formado, proveniente da diferenciação de células precursoras mesenquimais pluripotentes (68, 69, 87).

Por meio do VEGF liberado sobretudo pelo trofoblasto e células endoteliais, e do PlGF, inicia-se o estímulo para agrupamento dos vasos primordiais, e, assim, a indução à transição ao processo de angiogênese, e conseqüente processo de maturação do viló (68, 72). Por sua vez a angiogênese consiste na formação e crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes, e, portanto, pela proliferação de células endoteliais e musculares lisas (68). Em contrapartida, o trofoblasto, células endoteliais e monócitos também são responsáveis pela liberação fisiológica do sFlt1, um fator antiangiogênico, que se liga ao PlGF, inibindo, desta forma, a ação dele no estímulo à formação da vascularização placentária (83). A presença dos fatores antiangiogênicos é fundamental para o equilíbrio adequado entre formação e inibição de vasos sanguíneos placentários, aumenta com o avançar da gestação, regulando a placentação (69-71).

Os primeiros tubos endoteliais aparecem entre 21 e 32 dias pós-concepção, e o crescimento vascular continua ao longo da gestação. O desenvolvimento dos

primeiros capilares vilosos, a partir dos angioblastos, pode ser observado entre 10 e 12 semanas de gestação (72). Aproximadamente, 32 dias pós-concepção, os tubos endoteliais das vilosidades iniciam o contato entre si e com os vasos fetais do alantóide e do cordão umbilical primitivo, estabelecendo assim, uma circulação feto-placentária primitiva (69). Ao mesmo tempo ocorre a vasculogênese no alantóide, em direção embrionária e placentária. Deste período até 25 semanas pós-concepção, ocorre a formação da rede de capilares, predominando a ramificação angiogênica, sendo descritos dois mecanismos, por brotamento e por intussuscepção, sob estímulo parácrino do VEGF e do PlGF (69). Estes mecanismos permitem que os vasos disponham-se em paralelo, favorecendo um fluxo de baixa resistência.

A vasculogênese e parte da angiogênese ocorrem no vilo mesenquimal e no vilo intermediário imaturo. Os vilos intermediários imaturos são os principais locais de trocas nos primeiro e segundo trimestres, enquanto os vilos terminais ainda não se diferenciaram. Na sequência, em torno entre 15 e 32 semanas pós-concepção, a angiopoietina 1 e 2 e seu receptor Tie-2, associados ao PlGF, induzem a regressão de capilares periféricos e a formação de troncos vasculares centrais (vilo central), com desenvolvimento da camada média; de 25 semanas pós-concepção até o termo, aparecem os vilos maduros intermediários, que são longos e delgados, com capilares terminais pouco ramificados, mais alongados e intercalados, dispostos em série, crescendo predominantemente por angiogênese não-ramificada (69). Alguns capilares crescem em uma taxa maior do que o vilo e desenvolvem *loops* terminais e protuberâncias em direção à superfície trofoblástica, constituindo, dessa forma,

os vilos terminais. Cada vilo terminal é suprido por um ou dois capilares recobertos por uma camada fina de trofoblasto, formando a membrana sincício-capilar, a unidade funcional de troca materno-fetal. Os fluxos maternos e fetais de sangue não se misturam. Ao longo da gestação, os sinusoides dos capilares terminais dilatam e, de certa forma, compensam a maior impedância gerada pela disposição em série dos capilares.

Ao mesmo tempo está ocorrendo uma invasão de trofoblasto na região decidual, sendo chamados de trofoblasto extraviloso intersticial e endovascular. Este último tem a função fundamental no processo de remodelação das artérias espiraladas, e inicia-se após a implantação até 20 e 22 semanas de gestação. O trofoblasto endovascular invade as artérias espiraladas e substitui seu endotélio, degradando a camada muscular lisa, permitindo, dessa forma, a permanência de um fluxo útero-placentário alto e de baixa resistência, a fim de suprir o aumento constante do crescimento e necessidades do feto. O trofoblasto intersticial fica ao redor e cerca as artérias espiraladas.

O desenvolvimento da gestação e os resultados perinatais são dependentes da invasão trofoblástica e placentação adequadas, sendo esses processos influenciados por uma série de fatores, como nutrição, genética, estresse fisiológico e poluentes ambientais (45, 88). Dessa forma, o perfeito funcionamento do organismo materno é essencial à placentação e, conseqüentemente, à evolução da gestação e de seu produto conceptual.

3.2 – Poluição e as alterações placentárias

Na última década, um número crescente de estudos epidemiológicos mostrou que a exposição materna à poluição atmosférica implica aumento do risco de complicações obstétricas, apresentando, portanto, um potencial dano à saúde fetal, da futura criança e da mulher. Entre elas, as mais comuns estão os distúrbios hipertensivos, como a pré-eclâmpsia e a hipertensão gestacional, e os distúrbios de crescimento, como RCF e baixo peso ao nascer, até mesmo óbito fetal (8, 33, 89-91). Meta-análises demonstraram associações positivas entre a incidência de PE e a exposição ao MP_{2,5} e NO₂ (29, 89, 92), assim como O₃, CO, MP₁₀, SO₂ e NO_x foram associados aos distúrbios hipertensivos e ao déficit no crescimento fetal (28, 90, 91).

Tais morbidades obstétricas têm em comum em sua base fisiopatológica uma disfunção placentária subjacente, sobretudo prejuízos no desenvolvimento de sua vascularização e perfusão (65). Por conseguinte, estudos vêm sendo feitos na tentativa de elucidar se os mecanismos de ação da poluição atmosférica advêm de complicações na placentação, sobretudo em sua fase inicial, caracterizada pela invasão trofoblástica deficiente e falta da remodelação das artérias espiraladas, com consequente dano na vasculogênese e angiogênese placentária (47, 56, 61, 65-67).

Em resposta ao contato com poluentes, existem processos já estudados que já foram demonstrados, tanto sistêmicos como específicos da placenta, sendo os mais evidentes e relevantes as reações de estresse oxidativo, em que a partir da ativação de células inflamatórias, há formação de radicais livres de oxigênio e de nitrogênio que podem ser responsáveis por lesões no DNA e no endotélio

placentário, com diminuição global de metilação de DNA placentário e alterações epigenéticas; do mesmo modo, o sistema renina-angiotensina útero-placentário também pode ser alvo de modificações (1, 45, 48, 51, 62, 63, 93, 94). O endotélio também sofre ação de mediadores inflamatórios, gerando uma desorganização e disfunção endotelial, além de vasoconstrição (45). Todos estes mecanismos prejudicam o crescimento e a perfusão placentária, podendo diminuir as trocas materno-fetais e, conseqüentemente, o crescimento fetal. O sistema de coagulação sanguínea também pode ser alterado, com aumento de fibrinogênio plasmático, além dos níveis pressóricos maternos apresentarem maior chance de elevação, em razão do estresse oxidativo, disfunção endotelial, diminuição da resposta vasodilatadora ao óxido nítrico e aumento do tônus simpático, assim como pelo aumento da viscosidade sanguínea materna (45, 46, 95). As alterações descritas acima tornam a placenta inflamada e o processo de invasão trofoblástica comprometida, resultando em uma vascularização placentária prejudicada, e, portanto, com sua função limitada (41, 58, 96).

No intuito de avaliar respostas inflamatórias e sistêmicas e na placenta em resposta à exposição ao material particulado fino, MP_{2,5}, De Melo et al.(48) compararam grupos de ratas expostas à poluição antes da gestação, durante a gestação e em ambos os períodos, com um grupo controle que permaneceu em câmaras com ar limpo e filtrado. O estudo demonstrou que ratas grávidas expostas à poluição do ar, antes e durante a gestação, apresentaram um aumento de interleucina-4 na porção fetal da placenta, sugerindo uma resposta anti-inflamatória

da placenta ao processo inflamatório prévio induzido pelos poluentes no organismo materno.

Existem alterações patológicas placentárias que são características da exposição desta estrutura a um regime de hipóxia crônica, dentre elas, o aumento de células de Hofbauer, que são macrófagos da placenta que sintetizam VEGF, a presença de nós sinciciais, alterações na densidade vascular coriônica, seja reduzida ou aumentada (97), e o fator induzido por hipóxia (FIH), um fator de transcrição que responde a mudanças na tensão de oxigênio e hipóxia na placenta, levando a seu desenvolvimento inadequado (98). Partindo destas informações, Dutta et al. desenvolveram um ensaio clínico randomizado a fim de se avaliar se tais alterações estariam presentes em gestantes da Nigéria, sabidamente, expostas à poluição do ar doméstico em razão do cozimento domiciliar com querosene ou lenha, e compararam com um grupo de gestantes usuárias de fogão a base de etanol, além de um terceiro grupo controle de gestantes afro-americanas residentes em Chicago, usuárias de gás natural (98). O estudo mostrou que o grupo de usuárias de lenha/querosene apresentou na histologia das placentas um aumento de células de Hofbauer, de nós sinciciais e densidade vascular coriônica, além de maior expressão do FIH, modificações consequentes a um ambiente de baixa tensão de oxigênio e estresse oxidativo, causados pela presença da poluição do ar doméstico proveniente da combustão da lenha/querosene. O FIH, possivelmente, esteja aumentado em um esforço de adaptação na tentativa de se manter a homeostase do oxigênio, melhorando a angiogênese, no entanto, ainda não está claro se este aumento é sempre benéfico e protetor (99).

Veras *et al* (47), realizaram uma pesquisa experimental com modelo animal na cidade de São Paulo, a fim de se comparar a morfologia funcional placentária de ratas expostas à poluição atmosférica com as não expostas, separando os animais em três grupos: ratas expostas no período pré-gestacional, um segundo grupo na fase gestacional, e o terceiro grupo em ambos os tempos, sendo o grupo controle composto por ratas que permaneceram em câmaras com filtros, e que, portanto, inalavam ar atmosférico limpo. No primeiro grupo, observou-se redução do calibre médio do espaço preenchido por sangue materno; todavia houve um acréscimo da extensão de superfície capilar fetal, da condutância total da barreira intervascular e massa-específica de difusão de oxigênio. No segundo grupo, de ratas expostas no período gestacional, a análise mostrou placentas com seu calibre, volume e área sanguíneos diminuídos nos espaços maternos, em contrapartida, no lado fetal houve ampliação da superfície capilar e da massa-específica de condutância de oxigênio.

Os achados encontrados no primeiro grupo podem indicar que as alterações vasculares sejam sistêmicas e prévias à gestação, logo prejudicando o ambiente uterino, uma vez que mostraram detrimento da vasculatura placentária no sítio materno. Além disso, a fim de se conservar um fluxo feto-placentário adequado, e como resultado garantir o aporte de oxigênio e nutrientes frente aos déficits maternos, as mudanças no lado fetal sugerem uma tentativa de se adaptar em resposta a esse ambiente inóspito poluído. Contudo, frequentemente, são insuficientes, já que a incidência de RCF foi mais elevada no grupo exposto aos poluentes.

Em concordância com a hipótese de que a poluição atmosférica pode causar impacto danoso à vasculogênese e angiogênese placentária, na análise de um dos trabalhos provenientes do estudo realizado pelo grupo ProcriAR, em uma coorte prospectiva, demonstrou pela ultrassonografia tridimensional *Power Doppler* da placenta, realizada somente por um observador, que o índice de vascularização (IV) e o índice de vascularização e fluxo (IVF) da placenta estão significativamente diminuídos no primeiro trimestre em mulheres grávidas expostas a concentrações mais elevadas de NO₂, sendo esta exposição mensurada com o uso de amostradores passivos individuais, ou seja, consistiu no método mais adequado para prever o real contato com os poluentes. O resultado sugere que este poluente, assim como outros poluentes primários associados com o NO₂, influenciam a placentação e diminuem a vascularização placentária, por conseguinte, essa diminuição de vasos sanguíneos pode aumentar o risco da gestante cursar com desfechos adversos como a PE e RCF, fornecendo uma explicação de mecanismo potencial à associação epidemiológica já existente (61).

Além disso, o resultado do mesmo estudo ProcriAR, utilizando amostradores passivos individuais, mostrou que gestantes de baixo risco expostas a maiores concentrações de O₃, no segundo trimestre, apresentaram maiores índices de pulsatilidade da artéria umbilical, avaliado pelo estudo Dopplervelocimétrico na ultrassonografia obstétrica. Este efeito sugere uma influência prejudicial da poluição do ar na placentação e vascularização, já que reflete resistência ao fluxo sanguíneo na placenta, sendo este método amplamente utilizado na avaliação em gestações complicadas por insuficiência placentária, como PE e RCF (100).

3.3 – Poluição atmosférica e os fatores reguladores da angiogênese placentária

A função e a vascularização placentária podem ser avaliadas indiretamente pela mensuração sérica de alguns fatores angiogênicos, entre eles, destacam-se o VEGF e o PlGF, que promovem crescimento placentário, assim como pela medida de fatores anti-angiogênicos, sendo o mais usado a forma solúvel do receptor VEGFR-1, o sFlt-1. Ao se ligar às moléculas de VEGF e PlGF, o sFlt-1 impede que elas cheguem aos receptores de membrana, desta forma, inibindo suas atividades angiogênicas (56). Esta padronização foi possível por meio das pesquisas que relacionaram a quantidade desses fatores no sangue materno com a evolução para pré-eclâmpsia dessas pacientes, assim como a relação entre sFlt1 e o PlGF, detectando um desbalanço em suas concentrações séricas que levam a uma placenta disfuncional (73-75, 77, 78). Dessa forma, o PlGF se tornou preditor de PE e RCF no primeiro trimestre de gestação, e a relação sFlt1/PlGF preditora e ferramenta diagnóstica no segundo trimestre, ambos com melhor performance do que o sFlt1 isolado (76-78).

Conforme descrito acima, a poluição atmosférica está relacionada a essas complicações, aventando-se a hipótese de que a formação de um ambiente hipóxico-isquêmico pela ação dos poluentes no leito placentário resultaria em alterações nas concentrações dos fatores angiogênicos, diminuindo a produção de PlGF em razão das baixas tensões de oxigênio, sendo as reações de estresse oxidativo um importante estímulo ao aumento da produção placentária do fator anti-

angiogênico sFlt1 (72). Entretanto, poucos estudos pesquisaram se há relação entre a poluição do ar e a produção dos fatores angiogênicos placentários, sobretudo no primeiro trimestre.

Soto et al. (94) investigaram os efeitos da exposição a poluentes atmosféricos sobre a placenta, examinando substâncias que participam do processo de placentação, entre eles, a expressão proteica do VEGF-A e de seu receptor quinase 1 do fígado fetal (Flk-1) de ratas expostas à poluição previamente à gestação, durante, e em ambos os períodos, sendo comparadas com o grupo controle exposto apenas ao ar filtrado. Em todos os grupos expostos ao MP_{2,5}, houve diminuição da expressão do VEGF-A na face materna da placenta e do receptor Flk-1 no grupo exposto em ambos os períodos; e na face fetal redução do VEGF-A no grupo exposto durante a gestação e do receptor Flk-1 em todos os grupos expostos. Estes resultados, associados à redução da expressão gênica de VEGF-A no grupo exposto antes e durante à gestação, sugerem prejuízo na vascularização placentária. A massa, o tamanho e a área da placenta também estavam reduzidos.

No entanto, Van den Hooven *et al* (56), em 2012, realizaram o único estudo presente na literatura em que foram avaliados os efeitos da poluição atmosférica, mensurando os poluentes, sobre a concentração sérica dos fatores angiogênicos placentários. O trabalho consistiu em uma coorte prospectiva em Rotterdam, usando técnicas de modelagem de dispersão para estimar a exposição materna aos poluentes NO₂ e MP₁₀ para serem correlacionados com a dosagem de PlGF e o sFlt-1 séricos maternos, nos primeiro e segundo trimestres, e sérico fetal, sendo este pelo cordão umbilical no momento do parto. Foram detectados no sangue do

cordão fetal níveis mais elevados de sFlt1 e níveis mais baixos de PlGF nas gestantes com exposições médias mais altas a NO₂ e MP₁₀ durante a gestação. É possível que este estado anti-angiogênico represente mais o ambiente placentário do que fetal (96), corroborando a hipótese de que a poluição leve a este estado, dessa forma, mostrou-se que os níveis de fatores angiogênicos podem ter uma associação significativa com a poluição do ar, levando à angiogênese prejudicada. Os resultados maternos foram contraditórios, pois houve diminuição do PlGF e do sFlt-1 do segundo trimestre, quando associados tanto ao MP₁₀ como ao NO₂.

Em suma, como não são bem compreendidos os mecanismos fundamentais pelos quais a exposição de gestantes à poluição atmosférica, seja ao MP ou aos gases poluentes, poderiam prejudicar a placentação e a vascularização placentária, e como consequência, impedir o crescimento e o desenvolvimento fetal que seu potencial genético lhe confere, procuramos realizar este estudo supondo que a elevada exposição à poluição do ar poderia alterar as concentrações de fatores angiogênicos placentários no sangue materno e, portanto, afetar a evolução da gravidez, já que este mecanismo vem sendo implicado na patogênese da disfunção placentária em gestações que cursam com PE, RCF e hipertensão gestacional, que estão associadas à exposição à poluição atmosférica.

Material e Métodos

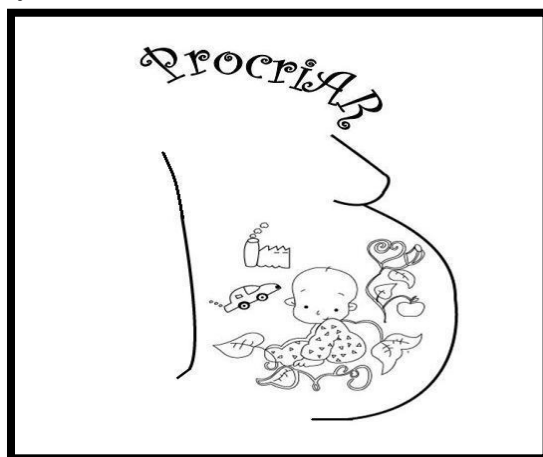
4 - MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo faz parte de um projeto intitulado "Impacto das exposições à poluição atmosférica durante a vida intrauterina e pós-natal sobre a saúde respiratória da criança", o ProcriAR, uma coorte prospectiva que inclui a avaliação de gestantes e crianças com o objetivo de verificar os efeitos da poluição do ar na saúde do binômio materno- fetal e da criança. O projeto teve início em março de 2011 com término em fevereiro de 2015, está vinculado ao INAIRA (Instituto Nacional de Análise Integrada de Risco Ambiental).

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob o número 193/11 (Anexo A) e pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Secretaria Municipal da Saúde da Prefeitura da cidade de São Paulo sob o número CAAE: 0205.0162.162-10, Parecer número 138/11. Os dados coletados neste estudo foram inseridos em um site (www.procriarsp.com.br) pelos diversos participantes. Foi também criado um logo para facilitar a identificação do projeto pelas gestantes e pelo restante dos pesquisadores (Figura 1).

O orçamento para execução do projeto ProcriAR foi aprovado como parte do edital 15/2008 CNPq/Fapesp - Instituto Nacional de Análise Integrada de Riscos Ambientais – INAIRA.

Figura 1 - Logo do projeto ProcriAR



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

4.1 - Desenho do estudo

O presente subprojeto foi uma coorte prospectiva, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número 193/11 (Anexo A), com amostra de conveniência recrutada do projeto ProcriAR, representada por 179 gestantes voluntárias no primeiro trimestre, residentes no Distrito de Saúde Escola do Butantã na cidade de São Paulo, todas de baixo risco, avaliadas no período entre outubro de 2011 a janeiro de 2014. As

gestantes foram convidadas a participar do estudo e aquelas que aceitaram assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

4.2 - Seleção e seguimento das pacientes

4.2.1 - Critérios de inclusão

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

4.2.2 - Critérios de exclusão:

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

4.3 - Recrutamento e dinâmica do projeto

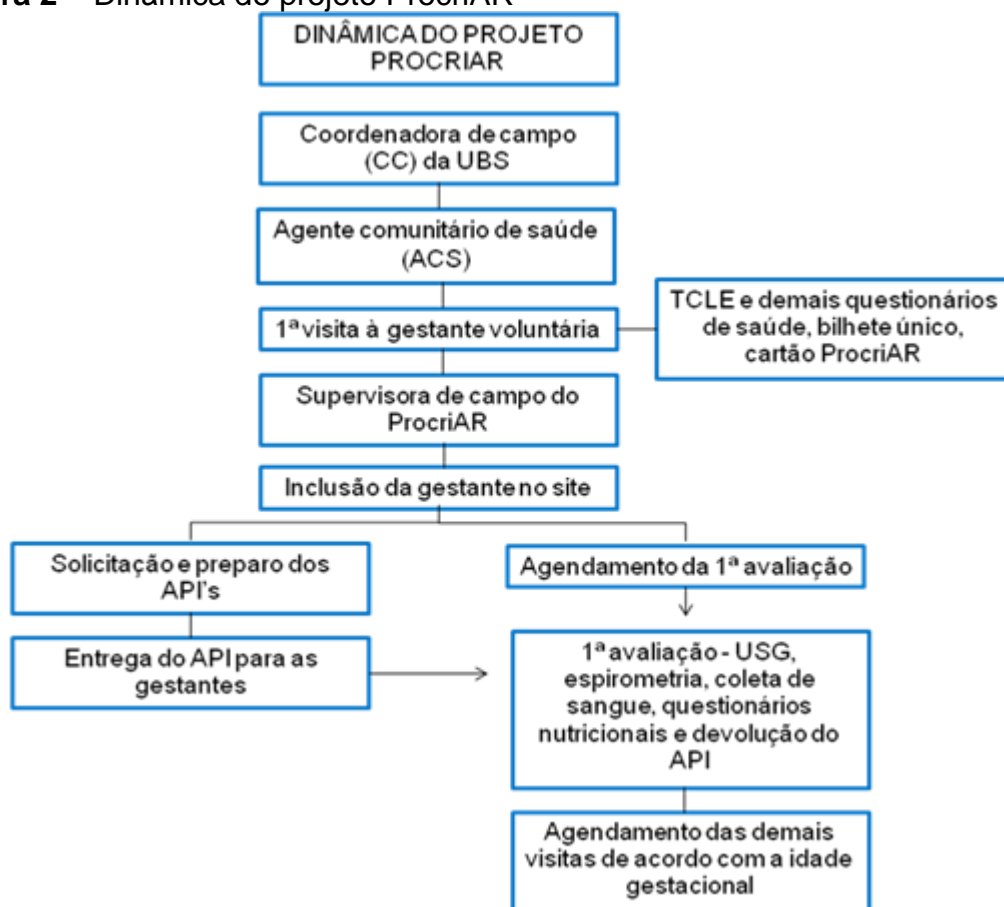
O recrutamento foi feito dentro do período de três anos, realizado por contato com as UBS's de interesse, assim que um caso positivo de gestação fosse confirmado, a gestante era questionada sobre a participação no estudo. A idade gestacional (IG), que era calculada por meio da data da última menstruação,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

Neste momento, após explicação detalhada sobre o estudo, era apresentado à gestante o TCLE e assinado caso concordasse participar. Concomitantemente, a gestante recebia um cartão do projeto ProcriAR com a data da primeira avaliação no HCFMUSP, respondia a questionários de identificação, questões socioeconômicas e inquérito domiciliar, e a respeito de seus antecedentes clínicos, assim como era orientada sobre os exames a serem realizados, como as coletas de sangue, ultrassonografias e espirometria, sendo estes dois últimos para os outros subprojetos. Seu cadastro no site era realizado com as informações coletadas. Além disso recebia um bilhete único para despesas de transporte público para ir e voltar do HCFMUSP. O peso e altura foram medidos duas vezes e, pela média de ambos, era calculado o IMC materno.

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

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

Figura 2 – Dinâmica do projeto ProcriAR



4.4 - Métodos

4.4.1 - Coleta de dados

As gestantes carregavam os API's de NO₂ e O₃ em ocasião próxima e anterior à data da ultrassonografia e os devolviam após o uso no retorno ao Hospital

das Clínicas. Os poluentes foram analisados, de acordo com seus respectivos protocolos.

Em todas as pacientes selecionadas, foi realizado exame de ultrassonografia pela mesma operadora, a autora deste estudo, confirmando a idade gestacional, e realizada a coleta de sangue no momento da ultrassonografia morfológica do primeiro trimestre, ou seja, entre 11 semanas e 13 semanas e 6 dias.

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

4.4.2 - Instrumento da coleta de dados

4.4.2.1 - Amostradores passivos Individuais de NO₂ e O₃

O agente comunitário de saúde entregava o API na casa da paciente 7-18 dias, antes da ecografia. As gestantes foram orientadas a usá-los fora da bolsa durante todo o dia, e durante à noite deixar no quarto onde dormiriam, ao lado da cama. Após esse período, os amostradores eram devolvidos no momento da realização da ultrassonografia, na Clínica de Medicina Fetal do Departamento de Obstetrícia da Universidade de São Paulo, Brasil (HCFMUSP), sendo então enviados ao Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Universidade de São Paulo, Brasil (LPAE / FMUSP), onde foram desmontados e armazenados até a

análise. Caso a gestante não comparecesse às avaliações ou esquecesse de levar o API ao atendimento no HCFMUSP, a mesma era contatada e orientada a devolvê-lo na própria UBS, ou então, o agente comunitário retirava-o na residência da gestante.

Os API's utilizados para amostragem de NO_2 e de O_3 foram desenvolvidos no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (9, 15, 21, 101).

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

Figura 3 - Filtros de celulose

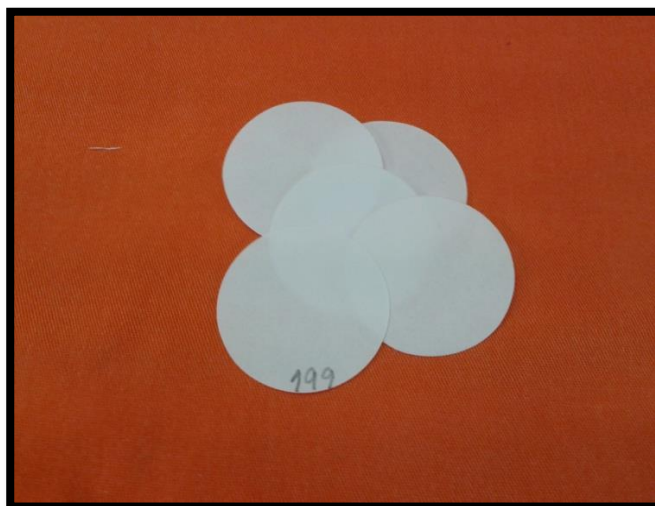
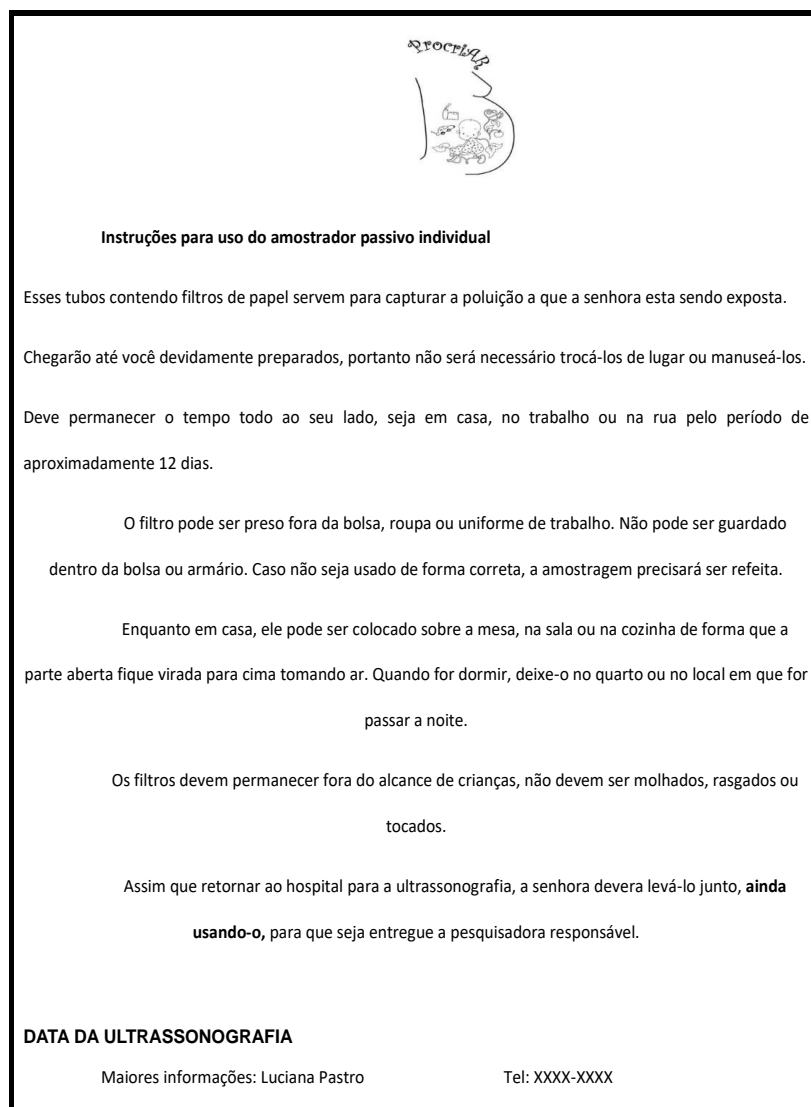


Figura 4 - Amostrador passivo individual pronto para ser embalado



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

Figura 5 - Instruções para uso do amostrador passivo individual



Os poluentes foram avaliados separadamente, de acordo com seus respectivos protocolos. Os filtros de NO₂ foram extraídos em até 24 horas, e analisados por espectrofotometria, caso não pudessem ser analisados ao mesmo tempo, poderiam ser congelados durante um período de duas semanas (Figura 6).

Pesquisas anteriores usaram o mesmo método para medir NO_2 (21, 101). Os filtros de O_3 poderiam ser analisados em qualquer momento após a exposição, sendo calculada a diferença entre a refletância final e inicial dos filtros, que foram medidos antes e depois da exposição, respectivamente (9, 15) (Figura 7).

Figura 6 - Comparação visual entre os filtros de dióxido de nitrogênio antes e após a exposição. Filtros não danificados. ($\text{NO}_2 = 1142,2 \times$ concentração de NO_2 em $\mu\text{g/ml}$ / tempo em dias)

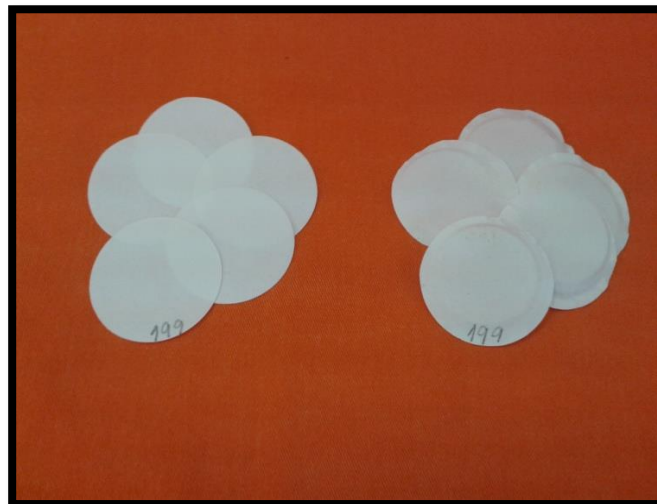
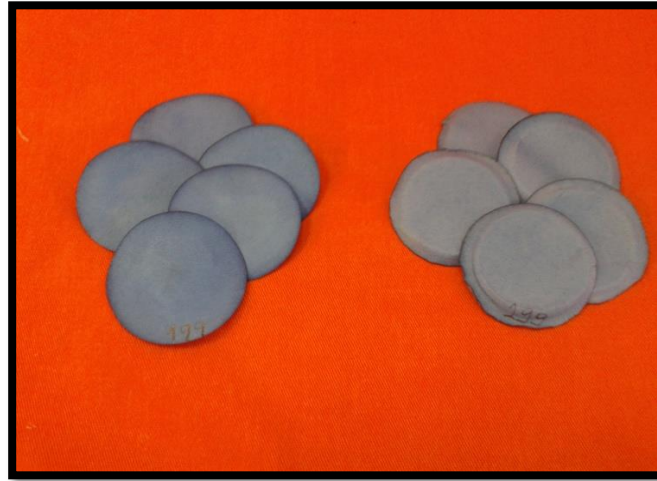


Figura 7 - Comparação visual entre os filtros de ozônio antes e após a exposição. Filtros não danificados. ($O_3 = 2,1629 \times (\text{reflectância final} - \text{inicial}) + 92,857$) / tempo em dia))



4.4.2.2 - Princípio do método de coleta e dosagem do PIGF e sFlt1

As pacientes foram submetidas à coleta de sangue venoso, por meio de punção venosa periférica, sendo as amostras de sangue acondicionadas em tubo de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e encaminhadas para análise no Laboratório de Investigação Médica 57 (LIM 57) da Disciplina de Obstetrícia. As variáveis resposta foram os fatores angiogênico e anti-angiogênio PIGF e sFlt1, respectivamente, e a relação entre elas (sFlt1/PIGF), uma vez que uma é dependente da outra. Os fatores reguladores de angiogênese placentária foram medidos por ELISA, conforme indicado pelas instruções do fabricante, usando kits Quantikine® (R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA). Um pesquisador executou as amostras em duplicata e não tem conhecimento dos resultados da posterior análise dos filtros dos amostradores individuais. Uma curva de calibração foi gerada para cada conjunto de amostras testadas para cálculo dos resultados. O coeficiente de variação intra e interensaio foi 5,8% e 5,94% para sFlt-1 e 15,7% e

16,9% para PIGF. A dose mínima detectável de PIGF foi 7 pg / mL e sFlt-1 foi 3,5 pg / mL, conforme descrição do fabricante dos kits reagentes.

Nesta técnica, para a dosagem dos fatores reguladores de angiogênese placentária, anticorpos monoclonais específicos para PIGF e sFlt-1 revestem uma microplaca com poços de análise, e as amostras séricas das pacientes são pipetadas nestes poços, dessa forma, qualquer molécula de PIGF ou sFlt-1 presente é ligada e imobilizada por seu anticorpo específico. Após esta etapa, é realizada uma lavagem da placa e quaisquer substâncias não ligadas são retiradas e um anticorpo policlonal ligado à enzima específica para PIGF ou sFlt-1 é adicionado aos poços de análise. Uma nova lavagem é feita para remover substâncias não ligadas aos anticorpos, em seguida, uma solução de substrato reagente com cor específica é adicionada aos poços para leitura dos resultados, e a intensidade da cor desenvolve-se em proporção à quantidade de PIGF ou sFlt-1 ligada na etapa inicial. O desenvolvimento da cor é interrompido e sua intensidade é medida por espectrofotometria que determina a quantidade dos fatores reguladores de angiogênese placentária avaliados presentes na amostra.

4.5 – Análise estatística

Na análise estatística inicial, foram utilizadas medidas descritivas como: média, mediana, mínimo, máximo e desvio-padrão às variáveis quantitativas, conforme o caso. Os dados qualitativos foram descritos por meio de frequências e porcentagens absolutas e relativas. A distribuição normal foi avaliada pelos testes

de Shapiro-Wilk, por meio dos gráficos de histograma e valor observado versus valor esperado. O teste de coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para quantificar a relação entre duas variáveis quantitativas. O teste T de *student* foi usado para comparação entre as médias dos valores das variáveis resposta (os fatores reguladores de angiogênese placentária PIGF e sFlt1, assim como a relação entre eles) entre grupos de pacientes tabagistas e não tabagistas, entre os grupos de gestantes nulíparas e múltiparas, assim como entre as gestantes brancas e não brancas, sendo todos os dados do primeiro trimestre de gestação.

Modelos de regressão linear múltiplos foram ajustados para avaliar o efeito dos poluentes NO₂ e O₃ na quantidade sérica dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos placentários, assim como na sua relação sFlt1/PIGF no primeiro trimestre. Em cada modelo, uma destas variáveis foi considerada como resposta: PIGF, sFlt1 e a relação sFlt1/PIGF. A transformação logarítmica para as variáveis respostas foi necessária para suposição da distribuição normal. As variáveis controle utilizadas foram a idade gestacional, idade materna, o IMC, o tabagismo, a paridade e a etnia da gestante.

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

Para cada modelo ajustado, a análise dos resíduos foi realizada para verificar os pressupostos do modelo de regressão linear. Não havia nenhuma evidência de violação dos pressupostos do modelo. A análise de *outliers* também foi realizada

para identificar pontos de influência no modelo ajustado e quando foram detectados pontos influentes, foi ajustado o modelo sem esses pontos, mas nenhuma mudança foi feita nos resultados de inferência.

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

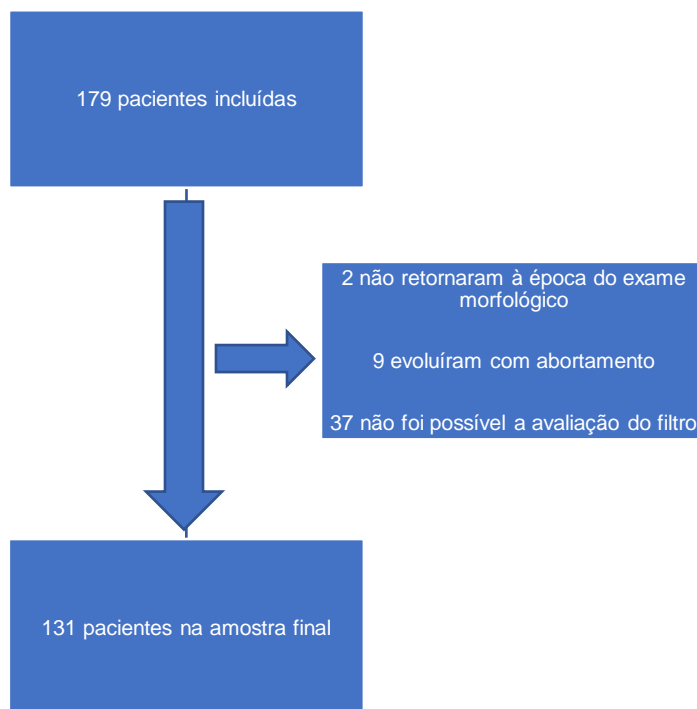
Resultados

5 – RESULTADOS

5.1 – Resultados Gerais

Inicialmente, o estudo recrutou 179 gestantes, porém durante o período de recrutamento foram excluídas 48 (26,8%) pacientes pelas seguintes razões: nove pacientes evoluíram com abortamento espontâneo; duas pacientes não retornaram na época correta para realização da ultrassonografia morfológica, ou seja, entre 11 semanas e 13 semanas e seis dias; 37 pacientes não fizeram uso de modo adequado dos filtros de poluentes, impossibilitando suas análises, tanto em razão dos danos físicos ao filtro como pelo uso incorreto de transportá-lo. Dessa forma, após tais exclusões pertinentes, a amostra final no primeiro trimestre foi composta por 131 gestantes. (Figura 8)

Figura 8 – Fluxograma de pacientes no primeiro trimestre



5.2 – Análise Estatística

As características descritivas das variáveis avaliadas no primeiro trimestre estão demonstradas nos dados da Tabela 1.

Tabela 1 – Características descritivas dos dados maternos, fatores reguladores de angiogênese placentária e poluentes coletados no primeiro trimestre (n=131)

| Características descritivas | Média ± DP/n(%) | Mediana(Mínimo– Máximo) |
|--|------------------------|--------------------------------|
| Idade Gestacional (semanas) | 12,5 ± 0,65 | 12,5 (11 – 13,86) |
| IMC (kg/m²) | 26,10 ± 5,6 | 24,96 (16,3 – 46,3) |
| Idade Materna (anos) | 25,57 ± 6,39 | 25 (13 – 40) |
| Tabagismo | | |
| Não | 111 (84,7%) | - |
| Sim | 20 (15,3%) | - |
| Paridade | | |
| Nulípara | 64 (48,9%) | - |
| Múltipara | 67 (51,1%) | - |
| Branca | 44 (33,5%) | - |
| Não-Branca | 87 (66,5%) | - |
| PIGF (pg/ml) | 40,04 ± 100,18 | 15,79 (0,78 – 677,08) |
| sFlt1 (pg/ml) | 398,91±498,77 | 165,92 (12,60– 2802,59) |
| sFlt1/ PIGF | 46,83 ± 122,19 | 12,37 (0,10 – 1176,31) |
| NO₂ (ug/m³) | 40,27 ± 16,9 | 40,29 (9,37 – 92,13) |
| O₃ (ug/m³) | 8,30 ± 1,09 | 8,12 (5,32 – 13,79) |

DP = desvio padrão; IMC = índice de massa corpórea; PIGF = placental growth fator; sFlt1 = soluble fms-like tyrosine kinase1; O₂ = dióxido de nitrogênio; O₃ = ozônio.

Análise de correlação de Spearman entre as variáveis respostas (sFlt1, PIGF, sFlt1/ PIGF), as variáveis controle (IG, IMC e idade materna) e os poluentes (NO₂ e O₃) estão demonstrados nos dados das Tabelas a seguir.

Nos dados da Tabela 2 abaixo, estão descritos os resultados entre fatores angiogênicos e antiangiogênicos placentários e suas correlações com a idade gestacional:

Tabela 2 – Coeficiente de correlação de Spearman entre os fatores reguladores de angiogênese placentária do primeiro trimestre e a idade gestacional

| | Coeficiente de correlação |
|--------------------|----------------------------------|
| PIGF | 0,060 |
| sFlt1 | 0,034 |
| sFlt1/ PIGF | 0,009 |

PIGF = placental growth fator; sFlt1 = soluble fms-like tyrosine kinase1

As correlações não se mostraram significativas estatisticamente.

Nos dados da Tabela 3, estão demonstradas as correlações entre fatores reguladores de angiogênese placentária e o IMC.

Tabela 3 – Coeficiente de correlação de Spearman entre os fatores reguladores de angiogênese placentária e o IMC no primeiro trimestre

| | Coeficiente de correlação |
|--------------------|----------------------------------|
| PIGF | 0,056 |
| sFlt1 | -0,188 |
| sFlt1/ PIGF | -0,177 |

PIGF = placental growth fator; sFlt1 = soluble fms-like tyrosine kinase1; IMC = índice de massa corpórea.

O sFlt1 e a relação entre sFlt1/PIGF apresentaram correlação fracamente negativa com o IMC.

Nos dados da Tabela 4, estão demonstradas as correlações entre fatores reguladores de angiogênese placentária e a idade materna.

Tabela 4 – Coeficiente de correlação de Spearman entre os fatores reguladores de angiogênese placentária do primeiro trimestre e a idade materna

| | Coeficiente de correlação |
|--------------------|----------------------------------|
| PIGF | 0,021 |
| sFlt1 | 0,091 |
| sFlt1/ PIGF | 0,090 |

PIGF = placental growth fator; sFlt1 = soluble fms-like tyrosine kinase1.

Não há correlações estatísticas significativas.

Nos dados da Tabela 5, mostramos a correlação entre as medidas dos poluentes NO₂ e O₃ dosados no primeiro trimestre. Observamos que não houve correlação entre eles.

Tabela 5 - Coeficiente de correlação de Spearman entre os poluentes dosados no primeiro trimestre

| | O ₃ |
|-----------------|-----------------------------------|
| NO ₂ | Coeficiente de correlação = 0,058 |

NO₂ = dióxido de nitrogênio; O₃ = ozônio.

Nos dados da Tabela 6, estão demonstradas as correlações entre os poluentes e as variáveis resposta, os fatores angiogênicos e antiangiogênicos placentários e a relação entre eles.

Tabela 6 – Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis fatores reguladores de angiogênese placentária e a exposição aos poluentes no primeiro trimestre

| | NO ₂ (1T) | O ₃ (1T) |
|-------------|----------------------|---------------------|
| PIGF | -0,193 | 0,111 |
| sFlt1 | 0,015 | -0,010 |
| sFlt1/ PIGF | 0,198 | -0,067 |

PIGF = placental growth fator; sFlt1 = soluble fms-like tyrosine kinase1; NO₂ = dióxido de nitrogênio; O₃ = ozônio; 1T = primeiro trimestre.

Observamos que há correlação fracamente significativa negativa entre o NO₂ e o PIGF e fracamente positiva entre este poluente e a relação sFlt1/ PIGF, no primeiro trimestre.

Os resultados relatados nos dados das Tabelas 7, 8 e 9 mostram que não houve diferença significativa nas comparações entre as médias dos valores das variáveis respostas entre grupos de pacientes tabagistas e não tabagistas, entre os grupos de gestantes nulíparas e múltiparas, assim como entre as gestantes brancas e não-brancas, sendo todos os dados do primeiro trimestre de gestação.

Tabela 7 – Apresentação das médias e desvio-padrão do logaritmo dos fatores reguladores de angiogênese placentária em gestantes tabagistas e não-tabagistas no primeiro trimestre

| | Média ± DP | p |
|--------------------------|-------------|-------|
| Log PIGF (pg/ml) | | |
| Não-Tabagista (n=111) | 2,78 ± 1,13 | 0,770 |
| Tabagista (n=20) | 2,86 ± 1,18 | |
| Log sFlt1 (pg/ml) | | |
| Não-Tabagista (n=111) | 5,34 ± 1,17 | 0,387 |
| Tabagista (n=20) | 5,09 ± 1,29 | |
| Log sFlt1/ PIGF | | |
| Não-Tabagista (n=111) | 2,56 ± 1,58 | 0,419 |
| Tabagista (n=20) | 2,22 ± 1,75 | |

Log = logaritmo; DP = desvio-padrão; PIGF = placentar growth fator; sFlt1 = soluble fms-like tyrosine kinase1; p-valores para o teste t de Student.

Tabela 8 – Apresentação das médias e desvio-padrão do logaritmo dos fatores reguladores de angiogênese placentária em gestantes nulíparas e múltíparas no primeiro trimestre

| | Média ± DP | p |
|--------------------------|-------------------|----------|
| Log PIGF (pg/ml) | | |
| Nulíparas (n=64) | 2,92 ± 0,95 | 0,221 |
| Múltíparas (n=67) | 2,67 ± 1,28 | |
| Log sFlt1 (pg/ml) | | |
| Nulíparas (n=64) | 5,48 ± 1,12 | 0,103 |
| Múltíparas (n=67) | 5,14 ± 1,23 | |
| Log sFlt1/ PIGF | | |
| Nulíparas (n=64) | 2,55 ± 1,57 | 0,746 |
| Múltíparas (n=67) | 2,46 ± 1,81 | |

Log = logaritmo; DP = desvio-padrão; PIGF = placentar growth fator; sFlt1 = soluble fms-like tyrosine kinase1; p-valores para o teste t de *Student*.

Tabela 9 – Apresentação das médias e desvio-padrão do logaritmo dos fatores reguladores de angiogênese placentária em gestantes brancas e não brancas no primeiro trimestre

| | Média ± DP | p |
|--------------------------|-------------------|----------|
| Log PIGF (pg/ml) | | |
| Branças (n=44) | 2,95 ± 1,25 | 0,259 |
| Não-brancas (n=87) | 2,71 ± 1,07 | |
| Log sFlt1 (pg/ml) | | |
| Branças (n=44) | 5,38 ± 1,26 | 0,616 |
| Não-brancas (n=87) | 5,26 ± 1,15 | |
| Log sFlt1/ PIGF | | |
| Branças (n=44) | 2,42 ± 2,05 | 0,715 |
| Não-brancas (n=87) | 2,55 ± 1,49 | |

Log = logaritmo; DP = desvio-padrão; PIGF = placentar growth fator; sFlt1 = soluble fms-like tyrosine kinase1; p-valores para o teste t de *Student*.

5.2.1 - Respostas das variáveis fatores reguladores de angiogênese placentária aos poluentes:

Os resultados dos modelos de regressão linear múltipla da análise do efeito dos poluentes sobre as variáveis respostas estão expostos os dados da Tabela 10, sem *outliers* quando presentes, incluindo também as variáveis controle que não apresentaram resultados significativos estatisticamente.

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

| Covariáveis | Coeficiente (B) | IC 95% para B | Coeficiente Padronizado (beta) | p-valor |
|--------------------------|-----------------|--------------------|--------------------------------|---------|
| Log PIGF (pg/ml) | | | | |
| NO ₂ | - 0,018 | (- 0,029 – -0,007) | - 0,294 | 0,001* |
| O ₃ | 0,191 | (0,028 – 0,355) | 0,198 | 0,022* |
| IG | -0,141 | (-0,416 – 0,133) | -0,087 | 0,310 |
| IMC | 0,027 | (-0,006 – 0,060) | 0,143 | 0,109 |
| IM | 0,025 | (-0,007 – 0,057) | 0,151 | 0,125 |
| Tabagismo | 0,331 | (-0,168 – 0,830) | 0,113 | 0,191 |
| Paridade | -0,651 | (-1,067 – -0,234) | -0,305 | 0,002* |
| Cor B x NB | -0,295 | (-0,673 – 0,082) | -0,131 | 0,124 |
| Log sFlt1 (pg/ml) | | | | |
| NO ₂ | 0,002 | (- 0,011 – -0,014) | 0,024 | 0,794 |
| O ₃ | -0,091 | (-0,282 – 0,100) | -0,084 | 0,347 |
| IG | 0,025 | (-0,292 – 0,342) | 0,014 | 0,876 |
| IMC | -0,047 | (-0,086 – -0,009) | -0,223 | 0,016* |
| IM | 0,044 | (0,007 – 0,081) | 0,237 | 0,020* |
| Tabagismo | -0,204 | (-0,785 – 0,376) | -0,062 | 0,487 |
| Paridade | -0,454 | (-0,934 – 0,026) | -0,191 | 0,064 |
| Cor B x NB | -0,199 | (-0,634 – 0,236) | -0,079 | 0,367 |
| Log sFlt1/ PIGF | | | | |
| NO ₂ | 0,020 | (0,002 – 0,038) | 0,204 | 0,026* |
| O ₃ | -0,283 | (-0,554 – -0,012) | -0,182 | 0,041* |
| IG | 0,159 | (-0,291 – 0,608) | 0,062 | 0,486 |
| IMC | -0,068 | (-0,122 – -0,014) | -0,225 | 0,015* |
| IM | 0,023 | (-0,030 – 0,075) | 0,086 | 0,395 |
| Tabagismo | -0,443 | (-1,266 – 0,380) | -0,094 | 0,289 |
| Paridade | 0,040 | (-0,641 – 0,721) | 0,012 | 0,908 |
| Cor B x NB | 0,115 | (-0,502 – 0,732) | 0,032 | 0,714 |

IC = intervalo de confiança; Log = logaritmo; sFlt1 = soluble fms-like tyrosine kinase1; PIGF = placentar growth fator; NO₂ = dióxido de nitrogênio; O₃ = ozônio; IG = Idade Gestacional; IMC = índice de massa corpórea; IM = idade materna; B x NB = branca x não-branca; * = p-valor estatisticamente significativo.

Nos dados da Tabela 11, abaixo estão demonstrados os modelos finais das análises de regressão linear múltipla entre o logaritmo das variáveis resposta fatores angiogênicos e antiangiogênicos placentários, assim como o logaritmo de sua relação e os poluentes. Além disso, concomitantemente, são mostradas as variáveis controle com p-valor menor que 0,05.

Dessa forma, podemos observar que o NO_2 apresenta um efeito negativo sobre o PIGF ($p = 0,003$ e $\beta = -0,257$) e positivo sobre a relação sFlt1/PIGF ($p = 0,009$ e $\beta = 0,225$). Já com relação ao O_3 , observamos um efeito significativo positivo sobre o PIGF ($p = 0,023$ e $\beta = 0,194$) e negativo sobre a relação sFlt1/PIGF ($p = 0,037$ e $\beta = -0,179$)

Não houve influência dos poluentes NO_2 e O_3 sobre o sFlt1.

Observamos que com relação às variáveis controle houve associação do sFlt1 negativa com o IMC e positiva com a idade materna, controlados pela paridade, já que pelo teste de Mann-Whitney a mediana do IMC e da idade materna entre os grupos nulíparas e múltiparas são diferentes e significativas. Além disso, o IMC apresentou efeito também negativo sobre a relação sFlt1/PIGF.

Tabela 11 – Estimativas dos coeficientes e valores de p dos modelos finais de regressão linear múltipla no primeiro trimestre

| Covariáveis | Coeficiente (B) | IC 95% para B | Coeficiente Padronizado (beta) | p-valor |
|--------------------------|-----------------|--------------------|--------------------------------|---------|
| Log PIGF (pg/ml) | | | | |
| NO ₂ | - 0,017 | (- 0,029 – -0,006) | - 0,257 | 0,003* |
| O ₃ | 0,203 | (0,028 – 0,378) | 0,194 | 0,023* |
| Paridade | -0,254 | (-0,632 – 0,123) | -0,112 | 0,185 |
| Log sFlt1 (pg/ml) | | | | |
| NO ₂ | 0,001 | (- 0,011 – -0,014) | 0,019 | 0,825 |
| O ₃ | -0,107 | (-0,294 – 0,080) | -0,098 | 0,258 |
| IMC | -0,044 | (-0,081 – -0,006) | -0,205 | 0,023* |
| IM | 0,045 | (0,008 – 0,082) | 0,242 | 0,016* |
| Paridade | -0,461 | (-0,930 – 0,008) | -0,194 | 0,054 |
| Log sFlt1/ PIGF | | | | |
| NO ₂ | 0,023 | (0,006 – 0,039) | 0,225 | 0,009* |
| O ₃ | -0,280 | (-0,542 – -0,018) | -0,181 | 0,036* |
| IMC | -0,064 | (-0,117 – -0,011) | -0,213 | 0,018* |
| Paridade | 0,112 | (-0,481 – 0,706) | 0,033 | 0,709 |

IC = intervalo de confiança; Log = logaritmo; sFlt1 = soluble fms-like tyrosine kinase1; PIGF = placentar growth fator; NO₂ = dióxido de nitrogênio; O₃ = ozônio; IMC = índice de massa corpórea; IM = idade materna; * = p-valor estatisticamente significativo.

Analisando os resultados das tabelas acima, é possível observar que a exposição da gestante a maiores níveis de NO₂ no ar, durante o primeiro trimestre, resultou em uma associação com menores concentrações séricas de PIGF, o que implica também em uma relação sFlt1/PIGF aumentada. Já com o O₃, os resultados foram inversos, igualmente no primeiro trimestre, porém em menores proporções

do que os efeitos com NO₂. Quanto maiores os níveis de exposição ao ozônio, maiores também foram as concentrações séricas de PIGF, dessa forma, menores os valores da relação sFlt1/ PIGF.

Discussão

6 – DISCUSSÃO

De acordo com a literatura atual publicada, este estudo é pioneiro em avaliar e demonstrar a associação entre a exposição individual da gestante à poluição atmosférica e às concentrações séricas maternas dos fatores angiogênicos PIGF, sFlt1, além da importante relação entre eles, durante o primeiro trimestre de gestação. O presente estudo demonstrou que a exposição individual de gestantes a concentrações mais altas de NO₂ teve influência negativa nas concentrações séricas de PIGF e um efeito positivo sobre a relação sFlt1/PIGF. Estes resultados corroboram a hipótese principal de que, no primeiro trimestre de gestação, a exposição a concentrações ambientais normais pode levar a um estado antiangiogênico materno, que pode estar refletindo um estado antiangiogênico no tecido placentário, acarretando por sua vez déficit na vascularização placentária.

Esta constatação sugere que a vascularização placentária pode ser prejudicada pela exposição à poluição do ar em concentrações ambientais normais, especificamente, a NO₂, que se correlaciona bem com outros poluentes primários e é um bom marcador da poluição urbana (102, 103). Com efeito, NO₂ e O₃ foram selecionados, como marcadores de exposição à poluição ambiente por várias razões. Em primeiro lugar, os amostradores passivos individuais poderiam ser usados sem incomodar as atividades diárias das pacientes que participaram do estudo. Em segundo lugar, apesar de a poluição atmosférica ser uma mistura

complexa de poluentes, o NO_2 é um poluente produzido por quase todos os processos de combustão e correlaciona-se bem com outros poluentes primários, como MP e CO. Portanto, acaba sendo um marcador apropriado de poluição urbana, além de ter sido demonstrado como um bom indicador da exposição à poluição do tráfego de veículos motorizados (102, 103). O O_3 representa um bom estimador da exposição aos poluentes gerados por processos fotoquímicos. Dessa forma, neste estudo NO_2 e O_3 foram considerados, como estimadores representantes, ou seja, *proxy* da mistura complexa que compõe a poluição urbana. Detalhes das análises foram publicadas pelo mesmo grupo de pesquisadores LPAE (15, 101, 104).

Além disso, o amostrador individual nos permite identificar o efeito de cada poluente sobre as variáveis placentárias, já que não houve correlação entre as medidas de NO_2 e O_3 , assim como Ritz et al. publicaram utilizando as estações fixas e o modelo de "land use regression" para medição (105). O O_3 é um poluente secundário proveniente de uma reação que depende do NO_2 , todavia está sujeito às condições climáticas, como nebulosidade e umidade, pois sua formação ocorre na presença de luz solar, e já o NO_2 depende, particularmente, da emissão veicular. Dessa forma, é difícil estabelecer uma relação exata entre eles e, na cidade de São Paulo, não há uma tendência específica (18).

O curso normal da gestação depende primordialmente do estabelecimento de uma interface vascular materno-fetal adequada no início da gravidez e do desenvolvimento placentário contínuo ao longo da gestação, a fim de que sua função seja apropriada, proveniente de uma rede vascular que permite o suprimento

sanguíneo necessário para o desenvolvimento do feto e evitando o estresse oxidativo e inflamatório local. Existem diversos eventos que podem prejudicar esse processo, ao provocar uma alteração na produção celular dos fatores angiogênicos no leito placentário, influenciando, assim, em sua vascularização e crescimento, repercutindo com desfechos adversos bem conhecidos e estudados consequentes da disfunção placentária, como RCF e PE. Embora acredite-se que a poluição atmosférica afete a placentação de gestantes, uma vez que há associação com essas complicações, além de existir a plausibilidade biológica em razão das já conhecidas propriedades oxidativas e inflamatórias dos gases poluentes, o conhecimento é limitado sobre como os poluentes interferem no crescimento e nos marcadores de função placentária, como VEGF, PlGF e sFlt1.

Em 2012, Van de Hooven et al.(56) mostraram que, no sangue do cordão umbilical, a dosagem de PlGF era menor e a de sFlt1 era maior em gestantes expostas a maior concentração de PM10 e NO₂. Tais achados revelam um estado antiangiogênico fetal, que poderia estar refletindo o estado materno no momento do parto. No entanto, o estudo mencionado acima usou técnicas de modelagem de dispersão em lugar de monitores pessoais para mensurar os poluentes em questão, o que pode não estimar a exposição real aos poluentes.

Nosso grupo já constatou que concentrações mais elevadas de NO₂, também mensuradas individualmente, em gestantes de baixo risco, estão negativamente associadas à vascularização placentária no primeiro trimestre, aferidas pela ultrassonografia tridimensional *Power Doppler* da placenta, e, portanto, levando a uma vascularização placentária abaixo do ideal (61). Os resultados da presente

pesquisa sugeriram que esta consequência poderia ocorrer pela elevação da relação sFlt1/PLGF, ou seja, um desequilíbrio dos fatores angiogênicos placentários.

Essas repercussões também são compatíveis com experimentos em ratas publicados por Veras et al.(47), que mostraram que na face materna da placenta houve redução da vasculatura em ratas grávidas expostas à poluição do ar em comparação àquelas em ar puro. Ao mesmo tempo, acredita-se que na tentativa de manter o suporte adequado ao feto, foi observada na face fetal da placenta uma diminuição da resistência ao fluxo sanguíneo.

Entretanto os níveis de PIGF tiveram associação positiva com a exposição a O₃. Este resultado está de acordo com o de Andikyan et al.(106), que estudaram micro e macroscopicamente as respostas placentárias de dois grupos de gestantes com insuficiência placentária, a saber, um grupo controle e um grupo tratado com O₃, com 39-40 semanas de gestação. Nas gestações complicadas, foi constatado um aumento no número de vasos pletóricos dilatados e em seu comprimento, além de um efeito estimulante na diferenciação das vilosidades terminais. A principal hipótese é que tais respostas estariam sendo mediadas pelo PIGF.

Em um estudo experimental com camundongos adultos, os autores titularam o VEGF após inalação de O₃ para explicar o mecanismo de vasodilatação que ocorre após a exposição a esse gás e observaram um aumento de 58% na área do vaso sanguíneo (107). Apesar da necessidade de mais pesquisas sobre esses mecanismos, podemos levantar a hipótese de que o O₃ possui propriedades positivas em termos de vascularização.

No entanto, em São Paulo, as concentrações de O₃ são inversamente correlacionadas com as de NO₂, já que esses poluentes consomem O₃ no ciclo fotoquímico. Assim, nossos resultados suportam o conceito de que os poluentes primários (representados pelo NO₂ como variável *proxy* das emissões de veículos automotivos) são mais significativos na promoção de efeitos adversos no tecido placentário do que os poluentes secundários, neste caso representados pelo O₃ (108).

A obesidade materna é uma comorbidade que está associada a desfechos adversos na gestação como PE, RCF, descolamento prematuro de placenta e até óbito fetal, ou seja, eventos relacionados à insuficiência placentária, sendo, portanto, considerada um fator de risco para manifestação dessas patologias obstétricas (77, 109). Apesar dos mecanismos envolvidos ainda não serem esclarecidos, sabemos que na população geral obesa há o desenvolvimento de doenças a partir de um estado inflamatório sistêmico, com lesão endotelial e alterações na angiogênese (110-112), sugerindo que tais processos sejam plausíveis de ocorrer na placentação das gestantes com sobrepeso e obesas, gerando uma placenta anormal e com déficit em suas funções.

Em virtude desse raciocínio, o IMC materno foi considerado uma importante variável controle, e foi mostrado que houve associação entre ela e o sFlt1, porém no sentido contrário ao esperado, quanto maior o IMC menores foram as concentrações do fator antiangiogênico, além de menor a relação sFlt1/PIGF. Tal resultado corrobora o resultado do estudo prospectivo de Straughen et al. (113), no qual os níveis séricos de sFlt1 eram significativamente maiores em gestantes com

IMC menor que 25; e os resultados de Zera et al (112), que em um estudo também prospectivo, demonstraram que o IMC materno apresentou associação inversa com os níveis de sFlt1 ao longo da gestação; além do mesmo resultado quando comparadas gestantes com e sem sinais clínicos de insuficiência placentária. As análises também foram ajustadas pela idade materna, etnia, paridade e comorbidades. Karge et al (114) mostraram que, além das concentrações menores de sFlt1 em gestantes com sobrepeso e obesas, a sensibilidade e desempenho foram menores do teste sFlt1/PIGF como preditor de desfechos adversos perinatais em pacientes obesas com PE. Tais dados nos permitem inferir que o IMC pode alterar a produção dos fatores angiogênicos e, por sua vez, a angiogênese e vascularização placentária; contudo, a explicação fisiopatológica para o aumento do risco de eventos relacionados à insuficiência desse órgão, nesse grupo de pacientes, deve ser investigada visando, concomitantemente, a outras causas, como inflamatórias e hormonais.

O tabagismo não mostrou correlação significativa com os fatores angiogênicos placentários. No entanto, há estudos mostrando que o ato de fumar está fortemente associado às complicações obstétricas relacionadas à insuficiência placentária já comentadas, comprometendo a vasculatura placentária, sendo já conhecido que gestantes tabagistas mostraram menor quantidade de tecido do parênquima placentário em razão, sobretudo, da redução no espaço intervilosos e de vilosidades terminais e, conseqüentemente, resultando uma diminuição de volume e área de superfície capilar (115, 116). Em nosso estudo, não quantificamos o número de cigarros consumidos por dia, considerando tabagista aquela gestante

que relatava consumo de qualquer quantidade de cigarro na gestação. Este fato pode ter interferido na ausência de influência do tabagismo nos índices vasculares placentários, observados em nosso estudo.

Uma limitação do estudo é a falta de um grupo controle em um centro não urbano, ou seja, uma região com baixos níveis de poluição do ar. No entanto, como a exposição à poluição do ar foi medida por meio de filtros individuais, podemos averiguar que diferenciados hábitos de vida levaram a exposições de diferentes concentrações de poluentes para cada paciente avaliada (81). Assim, gestantes que moram na mesma área podem estar expostas a distintos níveis de toxicidade de poluentes, dependendo de sua rotina diária, atividade ocupacional, meio de transporte utilizado e o tempo em um congestionamento. Além disso, a literatura mostrou que, durante a gravidez, cerca de 30% das mulheres mudam de endereço residencial (117), situação que não interfere nas medições dos poluentes dosados com a avaliação individual. Esse monitoramento preciso tornou-se possível com o desenvolvimento de amostradores passivos individuais, que ainda permitem avaliar a poluição dos ambientes internos, pois estão sempre com o indivíduo.

A explicação do porquê a poluição do ar causa resultados adversos na gravidez ainda não é totalmente compreendida e nosso estudo contribui na construção de hipóteses nessa área. Conhecer os possíveis mecanismos pelos quais os poluentes influenciam na gestação pode permitir a elaboração de coortes populacionais em diferentes centros com e sem níveis elevados dessas substâncias e possibilitar novas investigações.

Este foi o primeiro estudo que avaliou a associação entre a exposição individual à poluição atmosférica e os níveis de fatores angiogênicos séricos maternos, sFlt1 e PlGF, em gestantes no primeiro trimestre, de baixo risco, em uma cidade urbana com altos níveis de concentrações de poluentes atmosféricos, com o intuito de identificar um dos possíveis mecanismos fisiopatológicos dos efeitos desses poluentes sobre a placentação, ou seja, alterações na angiogênese e vasculogênese placentária. Os resultados apresentados, aliados aos descritos na literatura, mostram provável prejuízo e injúria no desenvolvimento da vascularização placentária, corroborando pesquisas que aprofundem os conhecimentos de tais mecanismos, e dessa forma, abrindo perspectivas futuras também para o desenvolvimento de políticas públicas que atuem na redução das emissões dos poluentes atmosféricos, melhorando a saúde da gestante e do feto.

Conclusões

7 – CONCLUSÕES

Resumindo, observou-se que a exposição materna individual a níveis mais elevados de NO₂ afetou negativamente os níveis de PIGF, um conhecido marcador pró-angiogênico, e diminuiu a razão sFlt1/PIGF no primeiro trimestre, sugerindo que este poluente e outros poluentes primários associados ao NO₂ prejudicam a angiogênese placentária, reduzindo, dessa forma, sua função. Como a placentação é o processo primário para o desenvolvimento normal do crescimento fetal e da gestação, estes achados podem sugerir que esse efeito negativo é uma das causas subjacentes de complicações na gravidez relacionadas à exposição a poluição do ar.

Anexos

8 - ANEXOS

Anexo A) Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



APROVAÇÃO

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

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


Pesquisador (a) Responsável: Rossana Pulcineli Vieira Francisco

Pesquisador (a) Executante: Luciana Duzolina Manfré Pastro

CEP-FMUSP, 16 de Agosto de 2011.



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



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

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



CIÊNCIA

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

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

Pesquisador (a) Responsável: **Rossana Pulcineli Vieira Francisco**

CEP-FMUSP, 29 de Abril de 2013.

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

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

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1.NOME:

SEXO : .M F

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

2.RESPONSÁVEL LEGAL

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

SEXO : .M F

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

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

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

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

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Pediatria da FMUSP

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

3.DURAÇÃO DA PESQUISA : 42 meses

A poluição do ar pode causar problemas respiratórios nas crianças. Este estudo tem o objetivo de analisar os efeitos da poluição do ar respirado pela gestante e pelas crianças no primeiro ano de vida sobre a saúde da mãe, da criança e o desenvolvimento de infecções respiratórias. Queremos analisar a exposição da

gestante a gases produzidos por indústrias e automóveis e também à fumaça de cigarro. Para isto, convidamos à senhora e seu filho a participarem deste estudo.

Serão colocados filtros (papel especial) em pequenos crachás entregues durante consultas de rotina ou na sua casa. Os crachás podem ser presos à roupa, bolsa ou sacola para que permaneçam o mais próximo possível do seu corpo. por 15 dias seguidos e serão trocados a cada 3 meses durante a gestação. A senhora irá realizar 3 exames de ultrassonografia durante a gravidez. Esse exame será feito da forma rotineira, no Hospital das Clínicas, para isso o projeto arcará com os custos das suas idas e retornos ao Hospital das Clínicas. Durante esse exame será avaliados sua frequência cardíaca, pressão arterial e será feito um exame para saber os efeitos da poluição no seu pulmão. Esse exame se chama espirometria. A senhora terá que soprar em um cano (bocal) descartável. Na primeira e na terceira ultrassonografia serão retirados 10 ml de sangue de sua veia para analisar algumas substâncias que fazem a placenta se desenvolver de forma correta. Caso seja diagnosticado algum problema nos seus exames que precise ser tratado em hospitais, a senhora terá sua consulta agendada no HC ou no HU. Após o nascimento, os crachás deverão permanecer próximos ao bebê, por 15 dias a cada 3 meses, no primeiro ano de vida. A senhora responderá perguntas sobre hábitos de vida, doenças que teve ou tem e sua alimentação. O bebê será acompanhado normalmente na Unidade Básica de Saúde. Durante visitas em sua casa ou, se preferir, durante consultas de rotina serão feitas perguntas sobre a saúde e alimentação do bebê, e medidas de peso e comprimento. Durante o primeiro ano de vida, caso a criança tenha problema respiratório que necessite avaliação médica, como chiado no peito, tosse e febre ou falta de ar, deve procurar o Hospital

Universitário onde será atendida e realizará exame da secreção nasal para pesquisar vírus. Este exame é feito rotineiramente no HU nestes casos. Os resultados desta pesquisa serão utilizados para orientar a senhora e sua família sobre as melhores formas para diminuir os efeitos da poluição sobre a saúde e como prevenir infecções respiratórias. Os membros de sua família que forem fumantes e desejarem abandonar este hábito poderão ser matriculados no grupo anti-tabágico do HU.

Garantimos a sua liberdade de não assinar ou retirar este consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo mesmo após o seu início, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu atendimento e de seu filho na UBS ou no HU. As informações serão analisadas em conjunto com outros pacientes. Não será divulgada a identificação do paciente. A senhora será mantida atualizada sobre os resultados da pesquisa. Não há despesas adicionais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Nos comprometemos a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

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

de Saúde - R. Gal. Jardim,36-1andar-V.Buarque- fone 33972464-email:
smscep@gmail.com.

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

_____ / / _____

Assinatura do paciente/representante legal

_____ / / _____

Assinatura da testemunha

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

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

_____ / / _____

Assinatura do responsável pelo estudo

Referências

9 - REFERÊNCIAS

1. Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2010;121(21):2331-78.
2. Olmo NR, Saldiva PH, Braga AL, Lin CA, Santos UeP, Pereira LA. A review of low-level air pollution and adverse effects on human health: implications for epidemiological studies and public policy. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(4):681-90.
3. Mirowsky J, Gordon T. Noninvasive effects measurements for air pollution human studies: methods, analysis, and implications. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2015.
4. de Oliveira BF, Chacra AP, Frauches TS, Vallochi A, Hacon S. A curated review of recent literature of biomarkers used for assessing air pollution exposures and effects in humans. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2014;17(7-8):369-410.
5. Costa S, Ferreira J, Silveira C, Costa C, Lopes D, Relvas H, et al. Integrating health on air quality assessment--review report on health risks of two major European outdoor air pollutants: PM and NO₂. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2014;17(6):307-40.
6. Hu YJ, Bao LJ, Huang CL, Li SM, Liu P, Zeng EY. Assessment of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons in a megacity of South China: Spatiotemporal variability, indoor-outdoor interplay and potential human health risk. *Environ Pollut*. 2018;238:431-9.
7. Orru H, Ebi KL, Forsberg B. The Interplay of Climate Change and Air Pollution on Health. *Curr Environ Health Rep*. 2017;4(4):504-13.
8. Bearblock E, Aiken CE, Burton GJ. Air pollution and pre-eclampsia; associations and potential mechanisms. *Placenta*. 2021;104:188-94.
9. Vieira SE, Stein RT, Ferraro AA, Pastro LD, Cosme Pedro SS, Lemos M, et al. Urban Air Pollutants are Significant Risk Factors for Asthma and Pneumonia in Children: The Influence of Location on the Measurement of Pollutants. *Archivos De Bronconeumologia*. 2012;48(11):389-95.
10. Cançado JE, Braga A, Pereira LA, Arbex MA, Saldiva PH, Santos UeP. [Clinical repercussions of exposure to atmospheric pollution]. *J Bras Pneumol*. 2006;32 Suppl 2:S5-11.
11. Rios J, Boechat J. Poluição intra e extradomiciliar. Universidade Federal do Rio de Janeiro: *Rev Bras Alerg Imunopatol*. 2011.

12. Shi XM. [Air pollution, climate change and health: from evidence to action]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2019;53(1):1-3.
13. Esposito S, Tenconi R, Lelii M, Preti V, Nazzari E, Consolo S, et al. Possible molecular mechanisms linking air pollution and asthma in children. *BMC Pulm Med*. 2014;14:31.
14. Mayhew TM. A stereological perspective on placental morphology in normal and complicated pregnancies. *J Anat*. 2009;215(1):77-90.
15. André CDSd, André PAd, Rocha FM, Saldiva PHN, Oliveira RCd, Singer JM. Reliability of reflectance measures in passive filters. *Atmospheric Environment*. 2014;92:178-81.
16. Liu NM, Miyashita L, Maher BA, McPhail G, Jones CJP, Barratt B, et al. Evidence for the presence of air pollution nanoparticles in placental tissue cells. *Sci Total Environ*. 2021;751:142235.
17. Umoh VA, Peters E. The relationship between lung function and indoor air pollution among rural women in the Niger Delta region of Nigeria. *Lung India*. 2014;31(2):110-5.
18. CETESB CADEDSP. Qualidade do ar no estado de São Paulo. . 2014.
19. Cincinelli A, Martellini T. Indoor Air Quality and Health. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(11).
20. Chow JC, Engelbrecht JP, Watson JG, Wilson WE, Frank NH, Zhu T. Designing monitoring networks to represent outdoor human exposure. *Chemosphere*. 2002;49(9):961-78.
21. Carneiro MFH, Ribeiro FQ, Fernandes-Filho FN, Lobo DJA, Barbosa Jr. F, Rhoden CR, et al. Pollen abortion rates, nitrogen dioxide by passive diffusive tubes and bioaccumulation in tree barks are effective in the characterization of air pollution. *Environmental and Experimental Botany*. 2011;72:272-7.
22. Liu C, Chen R, Sera F, Vicedo-Cabrera AM, Guo Y, Tong S, et al. Ambient Particulate Air Pollution and Daily Mortality in 652 Cities. *N Engl J Med*. 2019;381(8):705-15.
23. Santos NVD, Vieira CLZ, Saldiva PHN, Paci Mazzilli B, Saiki M, Saueia CH, et al. Levels of Polonium-210 in brain and pulmonary tissues: Preliminary study in autopsies conducted in the city of Sao Paulo, Brazil. *Sci Rep*. 2020;10(1):180.
24. Pasqua LA, Damasceno MV, Cruz R, Matsuda M, Martins MAG, Marquezini MV, et al. Exercising in the urban center: Inflammatory and cardiovascular effects of prolonged exercise under air pollution. *Chemosphere*. 2020;254:126817.

25. Sapkota A, Chelikowsky AP, Nachman KE, Cohen AJ, Ritz B. Exposure to particulate matter and adverse birth outcomes: a comprehensive review and meta-analysis. *Air Quality Atmosphere and Health*. 2012;5(4):369-81.
26. Pereira LA, Loomis D, Conceição GM, Braga AL, Arcas RM, Kishi HS, et al. Association between air pollution and intrauterine mortality in São Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect*. 1998;106(6):325-9.
27. Stieb DM, Chen L, Eshoul M, Judek S. Ambient air pollution, birth weight and preterm birth: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Research*. 2012;117:100-11.
28. Romão R, Pereira LA, Saldiva PH, Pinheiro PM, Braga AL, Martins LC. The relationship between low birth weight and exposure to inhalable particulate matter. *Cad Saude Publica*. 2013;29(6):1101-8.
29. Pedersen M, Stayner L, Slama R, Sørensen M, Figueras F, Nieuwenhuijsen MJ, et al. Ambient air pollution and pregnancy-induced hypertensive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Hypertension*. 2014;64(3):494-500.
30. van den Hooven EH, de Kluizenaar Y, Pierik FH, Hofman A, van Ratingen SW, Zandveld PY, et al. Air pollution, blood pressure, and the risk of hypertensive complications during pregnancy: the generation R study. *Hypertension*. 2011;57(3):406-12.
31. Olsson D, Mogren I, Forsberg B. Air pollution exposure in early pregnancy and adverse pregnancy outcomes: a register-based cohort study. *BMJ Open*. 2013;3(2).
32. Yorifuji T, Naruse H, Kashima S, Murakoshi T, Doi H. Residential proximity to major roads and obstetrical complications. *Sci Total Environ*. 2015;508:188-92.
33. Shah PS, Balkhair T, births KSGoDoPL. Air pollution and birth outcomes: a systematic review. *Environ Int*. 2011;37(2):498-516.
34. Blum JL, Chen LC, Zelikoff JT. Exposure to Ambient Particulate Matter during Specific Gestational Periods Produces Adverse Obstetric Consequences in Mice. *Environ Health Perspect*. 2017;125(7):077020.
35. Malley CS, Kuylenstierna JC, Vallack HW, Henze DK, Blencowe H, Ashmore MR. Preterm birth associated with maternal fine particulate matter exposure: A global, regional and national assessment. *Environ Int*. 2017;101:173-82.
36. Klepac P, Locatelli I, Korošec S, Künzli N, Kukec A. Ambient air pollution and pregnancy outcomes: A comprehensive review and identification of environmental public health challenges. *Environ Res*. 2018;167:144-59.

37. Cao Z, Meng L, Zhao Y, Liu C, Yang Y, Su X, et al. Maternal exposure to ambient fine particulate matter and fetal growth in Shanghai, China. *Environ Health*. 2019;18(1):49.
38. Melody SM, Ford J, Wills K, Venn A, Johnston FH. Maternal exposure to short-to medium-term outdoor air pollution and obstetric and neonatal outcomes: A systematic review. *Environ Pollut*. 2019;244:915-25.
39. Nobles CJ, Grantz KL, Liu D, Williams A, Ouidir M, Seeni I, et al. Ambient air pollution and fetal growth restriction: Physician diagnosis of fetal growth restriction versus population-based small-for-gestational age. *Sci Total Environ*. 2019;650(Pt 2):2641-7.
40. Simoncic V, Enaux C, Deguen S, Kihal-Talantikite W. Adverse Birth Outcomes Related to NO. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(21).
41. Li X, Huang S, Jiao A, Yang X, Yun J, Wang Y, et al. Association between ambient fine particulate matter and preterm birth or term low birth weight: An updated systematic review and meta-analysis. *Environ Pollut*. 2017;227:596-605.
42. Ananth CV, Kioumourtzoglou MA, Huang Y, Ross Z, Friedman AM, Williams MA, et al. Exposures to Air Pollution and Risk of Acute-onset Placental Abruption: A Case-crossover Study. *Epidemiology*. 2018;29(5):631-8.
43. Huang Y, Kioumourtzoglou MA, Mittleman MA, Ross Z, Williams MA, Friedman AM, et al. Air Pollution and Risk of Placental Abruption: A Study of Births in New York City, 2008-2014. *Am J Epidemiol*. 2021;190(6):1021-33.
44. Carvalho MA, Hettfleisch K, Rodrigues AS, Benachi A, Vieira SE, Saldiva SRDM, et al. Association between exposure to air pollution during intrauterine life and cephalic circumference of the newborn. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2021;28(8):9701-11.
45. Kannan S, Misra DP, Dvonch JT, Krishnakumar A. Exposures to airborne particulate matter and adverse perinatal outcomes: a biologically plausible mechanistic framework for exploring potential effect modification by nutrition. *Environ Health Perspect*. 2006;114(11):1636-42.
46. Liu S, Krewski D, Shi Y, Chen Y, Burnett RT. Association between gaseous ambient air pollutants and adverse pregnancy outcomes in Vancouver, Canada. *Environ Health Perspect*. 2003;111(14):1773-8.
47. Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Maciel Ribeiro AA, Mayhew TM, Saldiva PH, et al. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. *Biol Reprod*. 2008;79(3):578-84.

48. de Melo JO, Soto SF, Katayama IA, Wenceslau CF, Pires AG, Veras MM, et al. Inhalation of fine particulate matter during pregnancy increased IL-4 cytokine levels in the fetal portion of the placenta. *Toxicol Lett.* 2015;232(2):475-80.
49. Lavigne E, Yasseen AS, 3rd, Stieb DM, Hystad P, van Donkelaar A, Martin RV, et al. Ambient air pollution and adverse birth outcomes: Differences by maternal comorbidities. *Environ Res.* 2016;148:457-66.
50. Fajersztajn L, Veras MM. Hypoxia: From Placental Development to Fetal Programming. *Birth Defects Res.* 2017;109(17):1377-85.
51. Familiari M, Nääv Å, Erlandsson L, de Jongh RU, Isaxon C, Strandberg B, et al. Exposure of trophoblast cells to fine particulate matter air pollution leads to growth inhibition, inflammation and ER stress. *PLoS One.* 2019;14(7):e0218799.
52. Giovannini N, Cetera GE, Signorelli V, Parazzini F, Bainsi I, Cipriani S, et al. Carbon monoxide (CO) and nitric dioxide (NO). *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2020;33(13):2137-41.
53. Guimarães Filho HA, da Costa LL, Araújo Júnior E, Nardoza LM, Nowak PM, Moron AF, et al. Placenta: angiogenesis and vascular assessment through three-dimensional power Doppler ultrasonography. *Arch Gynecol Obstet.* 2008;277(3):195-200.
54. Chaddha V, Viero S, Huppertz B, Kingdom J. Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2004;9(5):357-69.
55. Hata T, Tanaka H, Noguchi J, Hata K. Three-dimensional ultrasound evaluation of the placenta. *Placenta.* 2011;32(2):105-15.
56. van den Hooven EH, Pierik FH, de Kluizenaar Y, Hofman A, van Ratingen SW, Zandveld PY, et al. Air pollution exposure and markers of placental growth and function: the generation R study. *Environ Health Perspect.* 2012;120(12):1753-9.
57. Dejmek J, Selevan SG, Benes I, Solanský I, Srám RJ. Fetal growth and maternal exposure to particulate matter during pregnancy. *Environ Health Perspect.* 1999;107(6):475-80.
58. Janssen BG, Godderis L, Pieters N, Poels K, Kiciński M, Cuypers A, et al. Placental DNA hypomethylation in association with particulate air pollution in early life. *Part Fibre Toxicol.* 2013;10:22.
59. Kingsley SL, Deyssenroth MA, Kelsey KT, Awad YA, Kloog I, Schwartz JD, et al. Maternal residential air pollution and placental imprinted gene expression. *Environ Int.* 2017;108:204-11.

60. Li Z, Fu J, Tang Y, Hua Q, Liu L, Zhao J. Air pollution and placental mitochondrial DNA copy number: Mechanistic insights and epidemiological challenges. *Environ Pollut.* 2019;255(Pt 2):113266.
61. Hettfleisch K, Bernardes LS, Carvalho MA, Pastro LD, Vieira SE, Saldiva SR, et al. Short-Term Exposure to Urban Air Pollution and Influences on Placental Vascularization Indexes. *Environ Health Perspect.* 2017;125(4):753-9.
62. Abraham E, Rousseaux S, Agier L, Giorgis-Allemand L, Tost J, Galineau J, et al. Pregnancy exposure to atmospheric pollution and meteorological conditions and placental DNA methylation. *Environ Int.* 2018;118:334-47.
63. Maghbooli Z, Hossein-Nezhad A, Adabi E, Asadollah-Pour E, Sadeghi M, Mohammad-Nabi S, et al. Air pollution during pregnancy and placental adaptation in the levels of global DNA methylation. *PLoS One.* 2018;13(7):e0199772.
64. Campbell S. Placental vasculature as visualized by 3D power Doppler angiography and 3D color Doppler imaging. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;30(6):917-20.
65. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod.* 2003;69(1):1-7.
66. Sircar M, Thadhani R, Karumanchi SA. Pathogenesis of preeclampsia. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015;24(2):131-8.
67. Phipps EA, Thadhani R, Benzing T, Karumanchi SA. Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(5):275-89.
68. Demir R, Seval Y, Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochem.* 2007;109(4):257-65.
69. Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta.* 2004;25(2-3):114-26.
70. Sundrani D, Khot V, Pisal H, Mehendale S, Wagh G, Joshi A, et al. Gestation Dependant Changes in Angiogenic Factors and Their Associations with Fetal Growth Measures in Normotensive Pregnancy. *PLoS One.* 82013.
71. Bergen NE, Bouwland-Both MI, Steegers-Theunissen RP, Hofman A, Russcher H, Lindemans J, et al. Early pregnancy maternal and fetal angiogenic factors and fetal and childhood growth: the Generation R Study. *Hum Reprod.* 2015;30(6):1302-13.

72. Y. W, S. Z. *Vascular Biology of the Placenta*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.
73. Costa RA, Hoshida MS, Alves EA, Zugaib M, Francisco RP. Preeclampsia and superimposed preeclampsia: The same disease? The role of angiogenic biomarkers. *Hypertens Pregnancy*. 2016;35(2):139-49.
74. Khalil A, Maiz N, Garcia-Mandujano R, Penco JM, Nicolaidis KH. Longitudinal changes in maternal serum placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 in women at increased risk of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016;47(3):324-31.
75. Nicolaidis PLCKH. First-trimester maternal factors and biomarker screening for preeclampsia - Poon - 2014 - *Prenatal Diagnosis* - Wiley Online Library. 2019.
76. Lobo GAR, Nowak PM, Panigassi AP, Lima AIF, Araujo Júnior E, Nardoza LMM, et al. Validation of Fetal Medicine Foundation algorithm for prediction of pre-eclampsia in the first trimester in an unselected Brazilian population. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2019;32(2):286-92.
77. Poon LC, Shennan A, Hyett JA, Kapur A, Hadar E, Divakar H, et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *Int J Gynaecol Obstet*. 2019;145 Suppl 1:1-33.
78. Rolnik DL, Wright D, Poon LCY, Syngelaki A, O'Gorman N, de Paco Matallana C, et al. ASPRE trial: performance of screening for preterm pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2017;50(4):492-5.
79. McElrath TF, Lim KH, 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(5):407.e1-7.
80. 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(7):911-9.
81. Steinle S, Reis S, Sabel CE. Quantifying human exposure to air pollution--moving from static monitoring to spatio-temporally resolved personal exposure assessment. *Sci Total Environ*. 2013;443:184-93.
82. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*. 1997;277(5332):1669-72.
83. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997;18(1):4-25.

84. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct.* 2001;26(1):25-35.
85. Anteby EY, Natanson-Yaron S, Greenfield C, Goldman-Wohl D, Haimov-Kochman R, Holzer H, et al. Human placental Hofbauer cells express sprouty proteins: a possible modulating mechanism of villous branching. *Placenta.* 2005;26(6):476-83.
86. Demir R, Kayisli UA, Seval Y, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir-Weusten AY, et al. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta.* 2004;25(6):560-72.
87. Eichmann A, Pardanaud L, Yuan L, Moyon D. Vasculogenesis and the search for the hemangioblast. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002;11(2):207-14.
88. Slama R, Darrow L, Parker J, Woodruff TJ, Strickland M, Nieuwenhuijsen M, et al. Meeting report: atmospheric pollution and human reproduction. *Environ Health Perspect.* 2008;116(6):791-8.
89. Hu H, Ha S, Roth J, Kearney G, Talbott EO, Xu X. Ambient Air Pollution and Hypertensive Disorders of Pregnancy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Atmos Environ (1994).* 2014;97:336-45.
90. Bai W, Li Y, Niu Y, Ding Y, Yu X, Zhu B, et al. Association between ambient air pollution and pregnancy complications: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Environ Res.* 2020;185:109471.
91. Li C, Yang M, Zhu Z, Sun S, Zhang Q, Cao J, et al. Maternal exposure to air pollution and the risk of low birth weight: A meta-analysis of cohort studies. *Environ Res.* 2020;190:109970.
92. Sun M, Yan W, Fang K, Chen D, Liu J, Chen Y, et al. The correlation between PM. *Sci Total Environ.* 2020;703:134985.
93. Saenen ND, Martens DS, Neven KY, Alfano R, Bové H, Janssen BG, et al. Air pollution-induced placental alterations: an interplay of oxidative stress, epigenetics, and the aging phenotype? *Clin Epigenetics.* 2019;11(1):124.
94. Soto SF, Melo JO, Marchesi GD, Lopes KL, Veras MM, Oliveira IB, et al. Exposure to fine particulate matter in the air alters placental structure and the renin-angiotensin system. *PLoS One.* 2017;12(8):e0183314.
95. Jedrychowski WA, Perera FP, Mauger U, Spengler J, Mroz E, Flak E, et al. Prohypertensive effect of gestational personal exposure to fine particulate matter. Prospective cohort study in non-smoking and non-obese pregnant women. *Cardiovasc Toxicol.* 2012;12(3):216-25.

96. Schlembach D, Wallner W, Sengenberger R, Stiegler E, Mörtl M, Beckmann MW, et al. Angiogenic growth factor levels in maternal and fetal blood: correlation with Doppler ultrasound parameters in pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;29(4):407-13.
97. Stanek J. Utility of diagnosing various histological patterns of diffuse chronic hypoxic placental injury. *Pediatr Dev Pathol.* 2012;15(1):13-23.
98. Dutta A, Khramtsova G, Brito K, Alexander D, Mueller A, Chinthala S, et al. Household air pollution and chronic hypoxia in the placenta of pregnant Nigerian women: A randomized controlled ethanol Cookstove intervention. *Sci Total Environ.* 2018;619-620:212-20.
99. Shimoda LA, Semenza GL. HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(2):152-6.
100. Carvalho MA, Bernardes LS, Hettfleisch K, Pastro LD, Vieira SE, Saldiva SR, et al. Associations of maternal personal exposure to air pollution on fetal weight and fetoplacental Doppler: A prospective cohort study. *Reprod Toxicol.* 2016;62:9-17.
101. Novaes P, do Nascimento Saldiva PH, Matsuda M, Macchione M, Rangel MP, Kara-Jose N, et al. The effects of chronic exposure to traffic derived air pollution on the ocular surface. *Environmental Research.* 2010;110(4):372-4.
102. Conceição GM, Miraglia SG, Kishi HS, Saldiva PH, Singer JM. Air pollution and child mortality: a time-series study in São Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect.* 2001;109 Suppl 3:347-50.
103. da Silva AS, Cardoso MR, Meliefste K, Brunekreef B. Use of passive diffusion sampling method for defining NO₂ concentrations gradient in São Paulo, Brazil. *Environ Health.* 2006;5:19.
104. Novaes P, do Nascimento Saldiva PH, Kara-José N, Macchione M, Matsuda M, Racca L, et al. Ambient levels of air pollution induce goblet-cell hyperplasia in human conjunctival epithelium. *Environ Health Perspect.* 2007;115(12):1753-6.
105. Ritz B, Qiu J, Lee PC, Lurmann F, Penfold B, Erin Weiss R, et al. Prenatal air pollution exposure and ultrasound measures of fetal growth in Los Angeles, California. *Environ Res.* 2014;130:7-13.
106. Andikyan VM, Voloshchuk IN, Kovganko PA, Clemente JM. Morphofunctional changes in the placenta after ozone therapy. *Bull Exp Biol Med.* 2000;130(7):715-8.
107. Araneda S, Commin L, Atlagich M, Kitahama K, Parraguez VH, Pequignot JM, et al. VEGF overexpression in the astroglial cells of rat brainstem following ozone exposure. *Neurotoxicology.* 2008;29(6):920-7.

108. Schuch D, de Freitas ED, Espinosa SI, Martins LD, Carvalho VSB, Ramin BF, et al. A two decades study on ozone variability and trend over the main urban areas of the São Paulo state, Brazil. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019;26(31):31699-716.
109. Schummers L, Hutcheon JA, Bodnar LM, Lieberman E, Himes KP. Risk of adverse pregnancy outcomes by prepregnancy body mass index: a population-based study to inform prepregnancy weight loss counseling. *Obstet Gynecol*. 2015;125(1):133-43.
110. Viridis A, Neves MF, Duranti E, Bernini G, Taddei S. Microvascular endothelial dysfunction in obesity and hypertension. *Curr Pharm Des*. 2013;19(13):2382-9.
111. Horton WB, Barrett EJ. Microvascular Dysfunction in Diabetes Mellitus and Cardiometabolic Disease. *Endocr Rev*. 2021;42(1):29-55.
112. Zera CA, Seely EW, Wilkins-Haug LE, Lim KH, Parry SI, McElrath TF. The association of body mass index with serum angiogenic markers in normal and abnormal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;211(3):247.e1-7.
113. Straughen JK, Misra DP, Kumar P, Misra VK. The influence of overweight and obesity on maternal soluble fms-like tyrosine kinase 1 and its relationship with leptin during pregnancy. *Reprod Sci*. 2013;20(3):269-75.
114. Karge A, Desing L, Haller B, Ortiz JU, Lobmaier SM, Kuschel B, et al. Performance of sFlt-1/PlGF Ratio for the Prediction of Perinatal Outcome in Obese Pre-Eclamptic Women. *J Clin Med*. 2022;11(11).
115. Rizzo G, Capponi A, Pietrolucci ME, Arduini D. Effects of maternal cigarette smoking on placental volume and vascularization measured by 3-dimensional power Doppler ultrasonography at 11+0 to 13+6 weeks of gestation. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;200(4):415.e1-5.
116. Pintican D, Poienar AA, Strilciuc S, Mihu D. Effects of maternal smoking on human placental vascularization: A systematic review. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2019;58(4):454-9.
117. Canfield MA, Ramadhani TA, Langlois PH, Waller DK. Residential mobility patterns and exposure misclassification in epidemiologic studies of birth defects. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2006;16(6):538-43.