

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEFROLOGIA**

**TRANSPORTE DE L-ARGININA ATRAVÉS DA MEMBRANA
CELULAR EM GESTANTES COM SÍNDROME DE PRÉ-ECLÂMPSIA**

IVAN CARLOS FERREIRA ANTONELLO

**Tese para postulação de título de doutorado
em Clínica Médica, sob orientação do Dr.
Carlos Eduardo Poli de Figueiredo**

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL, 1998

A634t Antonello, Ivan Carlos Ferreira

Transporte de L-Arginina através da membrana celular em gestantes com síndrome de pré-eclâmpsia / Ivan Carlos Ferreira Antonello ; orient. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo. – Porto Alegre: PUCRS, 1999.

87f. : gráf. tab.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica. (Área de concentração: Nefrologia)

1. Arginina. 2. Membrana celular. 3. Complicações cardiovasculares na gravidez. 4. Óxido nítrico. 5. Transporte biológico. 6. Proteínas de transporte. 7. Hipertensão. 8. Pre-eclâmpsia. 9. Feminino. 10. Gravidez. I. Figueiredo, Carlos Eduardo Poli de. II. Título.

C.D.U. 576.314:577.112.385(043.2)

C.D.D. 618.75

Dedico este trabalho a minha parceira pela vida afora e aos meus filhos, que chamo de amigos. Hilda, Jerônimo e Vicente têm permitido que continue eu na mais absoluta ignorância sobre o sentido das palavras impossibilidade e desânimo.

AGRADECIMENTOS

Nada é mais importante do que o reconhecimento. Conhecer não tem a importância de reconhecer. Conhecer exige curiosidade. Reconhecer não dispensa o afeto. Nada se guarda sem afeto. Neste trabalho, o que mais temo é o esquecimento de alguém ou algum momento que tenha contribuído para sua construção. Sem isso nunca poderei fechá-lo. Meus agradecimentos:

Ao Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo por sua paciência e permanente disponibilidade;

À professora Bartira Pinheiro pela simpatia e trabalho conjunto durante todo o processo;

Ao Dr. Domingos d'Avila por sua pertinácia em corrigir e melhorar sempre aquilo que se pensa concluído;

Ao Dr. João Steibel, colega e parceiro neste empreendimento;

Ao Dr. Fernando Ferverza pela insistência que permitiu o funcionamento de nosso primeiro laboratório de pesquisas;

Ao Dr. Osvaldo Estrela Anselmi que cedeu espaço para que nos instalássemos com centrífuga e vidrarias quando Laboratório era apenas um sonho;

Às Dras. Cynthia Caetano, Débora Gomes e Maria José de Carvalho pelo auxílio busca contínua de casos novos no Centro Obstétrico do Hospital São Lucas;

À Universidade e ao Hospital a quem pertenço e que me pertencem desde que me esqueci da época em que andávamos separados;

Aos amigos todos que participaram com obras, gestos ou palavras que permitiram manter tenaz meu interesse pelo trabalho em curso.

Aos meus pais a quem sempre agradeço por tudo e por qualquer coisa.

**“Que repouso, depois de tantas viagens, físicas e psíquicas!
Que prazer olhar para as malas fitando como para nada!
Dormita, alma dormita!
Aproveita, dormita!
Dormita!
É pouco tempo que tens! Dormita!
É a véspera de não partir nunca!”**

(Fernando Pessoa sob seu heterônimo Álvaro de Campos em *Ficções do Interlúdio*)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE QUADROS.....	x
LISTA DE GRÁFICOS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xv
I INTRODUÇÃO.....	1
1 Função do endotélio no controle da pressão arterial	3
2 Rota L-arginina - óxido nítrico e HA	4
3 Mensuração do ON circulante e gestação	7
4 Transporte de Membrana Celular.....	8
5 Este estudo	12
II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
1 Pré-eclâmpsia.....	15
1.1 <i>Classificação e características clínicas</i>	15
1.2 <i>Dados Epidemiológicos</i>	18
1.3 <i>Patogênese</i>	21
2 Óxido nítrico, gestação e transporte de membrana	24
III OBJETIVOS.....	32
1 Objetivo geral	32
2 Objetivos específicos	32
IV MATERIAL E MÉTODO.....	34
1 Delineamento	34
2 Definições para o estudo	34
3 Pacientes	35

3.1	<i>Critério geral de inclusão das pacientes</i>	36
3.2	<i>Crítérios de inclusão específicos nos grupos estudados</i>	36
3.3	<i>Crítérios de exclusão após iniciado o estudo</i>	37
4	Procedimento	38
5	Análise estatística	42
V	RESULTADOS	44
1	Avaliação do Transporte de L-arginina através da membrana celular nos grupos NG, GNO e DHGPE	46
2	Avaliação do transporte de L-arginina através da membrana celular nos subgrupos PE e PES	49
3	Avaliação do transporte de L-arginina através da membrana celular durante e após a gestação em pacientes com DHGPE	56
4	Avaliação do transporte de L- Arginina através da membrana celular em gestantes separadas pela gravidade do quadro clínico	58
VI	DISCUSSÃO	65
VII	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
	ANEXOS	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A acetilcolina interage com receptores da célula endotelial liberando substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio (Carvalho MH. Impacto da Hipertensão no envelhecimento vascular. São Paulo: Roche, 1995)	vi
Figura 2 - Via L-arginina-ON, da passagem do aminoácido até o relaxamento do músculo liso da parede do vaso (modificado de Moncada S, Higgs A) (85)	6
Figura 3 - Mecanismo postulado para a difusão facilitada (55)	10
Figura 4 - Concentração de uma substância e capacidade de difusão através de membrana, onde ocorre difusão simples e difusão facilitada. A linha tracejada mostra o V_{max} (55)	11
Figura 5 - Algoritmo do grupo de pacientes em estudo.....	35
Figura 6 - Índice de gestose de Goecke e Schwabe	39
Figura 7 - Algoritmo dos grupos para a primeira e segunda análise	45
Figura 8 - Algoritmo dos grupos para a terceira e quarta análise.....	45
Figura 9 - Algoritmo da primeira análise.....	46
Figura 10 - Algoritmo da segunda análise	49
Figura 11 - Algoritmo da terceira análise	56
Figura 12 – Algoritmo da quarta análise.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

DHGPE-	doença hipertensiva gestacional com pré-eclâmpsia
GMP_c-	Monofosfato cíclico de guanosina
GNO-	Gestação normal
HA-	hipertensão arterial
K_M-	constante de meia saturação
NG-	não gestantes
ON-	óxido nítrico
PA-	pressão arterial
PAD-	pressão arterial diastólica
PAS-	pressão arterial sistólica
PE-	pré-eclâmpsia
PES-	pré-eclâmpsia superposta
PGI₂-	prostaciclina
TXA₂-	tromboxane A ₂
V_{max}-	capacidade máxima de transporte através da membrana

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características demográficas e clínicas na apresentação do grupo de pacientes com DHGPE submetidas à avaliação durante e após a gestação	56
Quadro 2 - Correlações entre idade, PAS, PAD, Prot, V_{\max} e K_M	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Captação eritrocitária máxima de L-arginina nos grupos DHGPE, GNO e NG	47
Gráfico 2 - Constante de meia saturação para os grupos DHGPE, GNO e NG	48
Gráfico 3 - Captação eritrocitária máxima de L-arginina nos grupos PE e PES.....	51
Gráfico 4 - Constante de meia saturação nos grupos PE e PES.....	51
Gráfico 5 - Captação eritrocitária máxima de L-arginina nos grupos PE e NG	53
Gráfico 6 - Constante de meia saturação nos grupos PE e NG.....	53
Gráficos 7 e 8 - Captação eritrocitária máxima de L-arginina e constante de meia saturação nos grupos PE e GNO	55
Gráfico 9 - Captação eritrocitária máxima de L-arginina durante e após a gestação de pacientes com DHGPE	57
Gráfico 10 - Constante de meia saturação durante e após a gestação de pacientes com DHGPE.....	58
Gráfico 11 - Captação eritrocitária máxima de L-arginina em gestantes com DHGPE leve e em gestantes com DHGPE moderada e severa	61
Gráfico 12 - Constante de meia saturação em gestantes com DHGPE leve e com DHGPE moderada e severa.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos grupos estudados	46
Tabela 2 - V_{\max} e K_M nos grupos NG, GNO e DHGPE	47
Tabela 3 - Características dos subgrupos PE e PES	50
Tabela 4 - Características dos subgrupos PE e PES	50
Tabela 5 - PAS, PAD, edema e proteinúria de 24 horas nos subgrupos PE e PES	51
Tabela 6 - V_{\max} e K_M nos subgrupos PE e PES	51
Tabela 7 - V_{\max} e K_M nos grupos PE e NG.....	53
Tabela 8 - V_{\max} e K_M no grupo PE e GNO.....	55
Tabela 9 - Médias de V_{\max} e K_M durante e após a gestação de pacientes com DHGPE.....	57
Tabela 10 - Características dos subgrupos, separados por gravidade do quadro clínico.....	59
Tabela 11 - Médias de V_{\max} e K_M em pacientes com DHGPE moderado ou severo e em pacientes com DHGPE leve.....	60

RESUMO

Na última década, uma nova hipótese tem sido formulada para explicar vários achados associados com síndrome de *pré-eclâmpsia*. Hipertensão arterial (HA), proteinúria, edema e hipercoagulabilidade parecem fazer parte de um conjunto de evidências derivadas de mecanismo fisiopatológico único: disfunção da célula endotelial vascular materna. Nessa célula, a partir do aminoácido *L-arginina*, é produzido o óxido nítrico (ON), potente vasodilatador cuja atividade e relação com gestação e *pré-eclâmpsia* têm sido estudadas.

Esse trabalho pretendeu analisar o transporte de L-arginina (substrato de ON) através da membrana celular em: 1- gestantes com síndrome de *pré-eclâmpsia* (DHGPE) divididas em dois subgrupos denominados, respectivamente, de *pré-eclâmpsia primária* (PE) e *pré-eclâmpsia superposta à HA*(PES); 2- gestantes normais (GNO); e 3-mulheres não gestantes normais (NG).

Foram incluídas, no estudo, mulheres entre 15 e 40 anos, sem doença renal conhecida. Determinou-se a capacidade máxima de transporte eritrocitário de L-arginina (V_{\max}) e a constante de meia saturação (K_M). O

eritrócito foi utilizado como modelo para avaliação do transporte de membrana e a L-arginina marcada com carbono radioativo.

Com a metodologia utilizada, concluiu-se, neste estudo, que: 1- V_{\max} esteve aumentado em gestantes com DHGPE, quando comparadas à NG e GNO; 2- K_M esteve diminuído em DHGPE e GNO, comparadas à NG; 3- V_{\max} esteve aumentado e K_M diminuído em PES, comparadas à PE; 4- V_{\max} não modificou e K_M aumentou, significativamente, quando comparadas a última semana de gestação com o período de pós-parto precoce em DHGPE; 5- V_{\max} e K_M não se alteraram, significativamente, em pacientes com DHGPE quando comparados pela gravidade do quadro clínico.

SUMMARY

During the past decade new hypothesis have been formulated to explain abnormal findings associated with the particular pregnancy syndrome called *Preeclampsia*. Hypertension, edema, proteinuria, and an hypercoagulation state seem to participate in a setting of evidences stemming from a unifying pathophysiological mechanism: maternal vascular endothelial cell dysfunction. In, and from, this cell the aminoacid *L-arginine* produces nitric oxide (ON), a potent vasodilator. The relationship between ON and the preeclampsia syndrome has been extensively evaluated.

This work intends to compare L-arginine transport across the cell membrane in: 1- pregnant women with preeclampsia syndrome (GHDPE). This group was further divided into two subgroups: primary preeclampsia (PE) and preeclampsia superimposed to hypertension (SPE); 2- normal pregnant (NP) and; 3- non-pregnant normal women (NW).

Only women aged between 15-40 year with no previous renal disease were included in the study. Total erythrocyte L-arginine uptake (V_{\max}) and half-saturation constant were evaluated, with ^{14}C as marker.

The following results were obtained: 1- V_{\max} was increased in GHDPE comparing to NP and NW; 2- K_M was diminished in GHPDE and NP comparing to NW; 3- V_{\max} was increased, and K_M diminished, in SPE comparing to PE; 4- V_{\max} was unchanged, and K_M increased, when comparing the last week of pregnancy and immediate post-partum; 5- V_{\max} and K_M did not change in GHDPE, when separated by severity of clinical presentation.

I INTRODUÇÃO

Hipertensão arterial (HA) na gestação, por suas complicações, é a causa mais freqüente de morte materna em países desenvolvidos (12). Nos países em desenvolvimento, juntamente com hemorragia e infecção, é responsável pelo alto índice de óbitos maternos, crescimento intra-uterino retardado, prematuridade e outras situações que predispõem à morbidade e mortalidade fetal e neonatal (3, 4, 53, 87, 100).

No Brasil, a situação é desconfortável no tocante à mortalidade materna decorrente de complicações da gestação. Dados do Ministério da Saúde colocam o país entre os com alta taxa de mortalidade materna, por nascidos vivos: ao lado de Peru, Equador, Bolívia, Haiti e países africanos (4). Morre uma mulher a cada duas horas no país, segundo estudo da Coordenação Materno Infantil do Ministério da Saúde (8).

Sabe-se que gestantes que adoecem fazem mais consultas, hospitalizam-se mais, correm maior risco de vida, podem parir prematuros que são internados em unidades de terapia intensiva e que, quando sobrevivem - não raro - tornam-se deficientes (87). Estes geram custo ao Estado, que se encarrega da maior parte das consultas, hospitalizações,

reabilitações e pensões destes doentes. A identificação de fatores de risco e marcadores para doença hipertensiva gestacional/pré-eclâmpsia (DHGPE) poderia proporcionar o acompanhamento precoce de gestantes expostas, o que levaria à redução de custos afetivo e financeiro que cercam a gravidez de alto risco (103).

Os mecanismos fisiopatológicos da DHGPE são pouco conhecidos. Entre as suposições enfatizadas pela literatura, a alteração do metabolismo das prostaglandinas e da função do endotélio do vaso merecem investigação intensa pela possibilidade de afetar a reatividade e a coagulação intravascular (12, 85, 102). Estão descritas, também, anormalidades do metabolismo iônico intracelular e do transporte através da membrana celular (7, 43 ,76, 81, 110, 130).

Na **Revisão Bibliográfica**, discutem-se as dificuldades de classificação e a variada nomenclatura para designar doença hipertensiva gestacional. As referências consultadas, em sua maior parte, usam o termo pré-eclâmpsia (PE) para designar todas as formas de doença hipertensiva gestacional, acompanhadas de síndrome de pré-eclâmpsia (hipertensão arterial, proteinúria significativa e edema) (120). A partir de **Material e Método**, para discriminar PE primária da gestação e PE superposta à hipertensão (PES), utiliza-se a classificação proposta pelo “American College of Obstetricians and Gynecologists” em 1972, a qual foi ratificada pelo “National High Blood Pressure Education Program Working Group (HBPP)”, em 1990 (11, 90). Quando não há clara definição por um desses grupos, ou quando se quer agrupá-los sob um único título, utiliza-se o termo doença hipertensiva gestacional com pré-eclâmpsia (DHGPE) para incluir todas gestantes com o quadro identificado por Taylor et al.(120), como síndrome de pré-eclâmpsia.

1 Função do endotélio no controle da pressão arterial

O endotélio vascular tem importante função na regulação da resistência periférica e, portanto, na regulação da pressão arterial (PA) sistêmica. As células endoteliais têm participação direta nos mecanismos contráteis e relaxadores da microcirculação através da produção de substâncias vasoativas que atuam localmente, modulando o tônus das células musculares lisas da parede dos vasos adjacentes (figura 1). A produção dessas substâncias é ativada por alterações na concentração de mensageiros intracelulares, como monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e cálcio, a partir de interações das células endoteliais com constituintes do plasma (por exemplo, plaquetas).

As substâncias vasoativas podem ser classificadas em duas classes: **fatores relaxantes** (óxido nítrico (ON), prostaciclina (PGI_2) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio) e **fatores constritores** (endotelina, tromboxane, angiotensina II e radicais oxigenados livres) do endotélio (12, 75, 85).



Figura 1 - A acetilcolina interage com receptores da célula endotelial liberando substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio (Carvalho MH. Impacto da Hipertensão no envelhecimento vascular. São Paulo: Roche, 1995)

O endotélio vascular, também, inativa substâncias vasoativas, como serotonina e bradicinina. Há evidências de desequilíbrio na síntese endotelial de vasodilatadores e vasoconstritores, na gênese da HA sistêmica e na DHGPE (12). Disfunção da célula endotelial pode causar HA pelo aumento de produção de agentes vasoconstritores, como endotelina, ou pela reduzida liberação de agentes vasodilatadores, como óxido nítrico (85, 112).

Outro importante mecanismo no controle da contração e relaxamento da microcirculação é a formação de ácido aracdônico, a partir de fosfolipídeos da membrana celular. A ação da ciclo-oxigenase sobre o ácido aracdônico resulta na produção de uma série de metabólitos que podem levar à vasoconstricção ou vasodilatação. Entre estes metabólitos, estão a prostaciclina (PGI_2) e o tromboxane A_2 (TXA_2). PGI_2 promove vasodilatação e determina inibição da agregação das plaquetas ao endotélio e TXA_2 induz vasoconstricção e agregação plaquetária, aumentando a possibilidade de fenômenos de trombose na microcirculação. O equilíbrio da produção desses metabólitos, de ações opostas, é responsável pela adequação da atividade das células endoteliais (75). Há relato de possíveis implicações fisiopatológicas a partir do desequilíbrio da produção de PGI_2 e TXA_2 na DHGPE (72, 41).

2 Rota L-arginina - óxido nítrico e HA

Em 1980, Furchgott e Zawadzki (47) demonstraram que o relaxamento vascular induzido pela acetil-colina era dependente da presença do endotélio e o efeito mediado por um fator humoral lábil, mais tarde, denominado fator relaxante derivado do endotélio (47, 48). Até, então, o ON era, apenas, conhecido como mais um poluente atmosférico. Atualmente, sua participação em vários sistemas biológicos é bem documentada, incluindo

regulação da PA, neurotransmissão (que pode responder por várias funções, incluindo a formação da memória), inibição da ativação leucocitária, inibição da síntese total de proteínas pelo fígado e papel não bem estabelecido na regulação adrenal (85, 86).

ON é um gás e radical livre altamente difusível. A síntese do ON na célula endotelial do vaso permite a atividade em estruturas vizinhas, como a musculatura lisa da parede vascular, onde pode produzir relaxamento e conseqüente vasodilatação (79, 85). O relaxamento vascular dependente do endotélio parece diminuído em pacientes com HA essencial, sugerindo que a deficiente geração de ON possa contribuir para o desenvolvimento de níveis pressóricos elevados (17, 44). Tratamentos com inibidores da síntese de ON induzem resposta hipertensiva em animais, acompanhada por diminuição na excreção de sódio (que pode se tornar irreversível por dano glomerular (48).

ON é sintetizado por uma família de enzimas (as *ON sintases*) a partir do aminoácido L-arginina, através de uma rota metabólica denominada *rota L-arginina-óxido nítrico* (figura 2). A ação das ON sintases sobre a L-arginina levam à formação de ON e citrulina, sendo a citrulina um metabólito aparentemente inativo desta reação. O tratamento com L-arginina previne o desenvolvimento de HA em animais predispostos, causa redução rápida da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), quando o aminoácido é infundido em pessoas saudáveis e em pacientes com HA primária (85, 86).

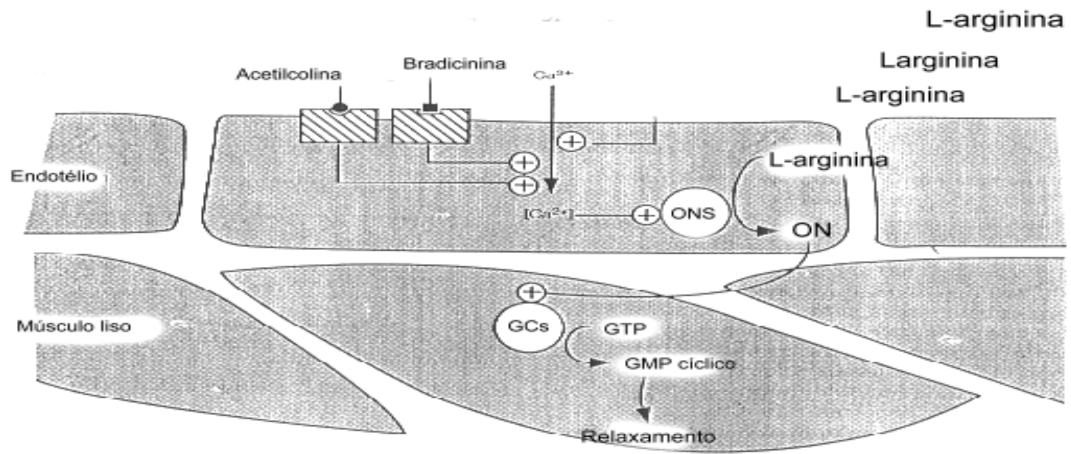


Figura 2 - Via L-arginina-ON, da passagem do aminoácido até o relaxamento do músculo liso da parede do vaso (modificado de Moncada S, Higgs A) (85)

Derivados metilados da L-arginina, que incluem a N^{G} -monometil L-arginina (LNMMA) e nitro arginina metil ester (L-NAME), podem acumular-se no plasma em algumas situações patológicas - como insuficiência renal aguda. A inibição da ON sintase por estes compostos pode, em parte, explicar a presença de HA nestas circunstâncias (48, 85).

Pode se especular que o aporte aumentado de L-arginina, em pacientes predispostos à síndrome de pré-eclâmpsia, diminuiria sua morbidade, pois aumentar a atividade de ON circulante, produz vasodilatação periférica e promove um “estado antitrombose” (70, 86, 104). ON é um importante fator na vasodilatação homeostática e previne a agregação e adesão plaquetária. Isso parece contribuir para a vasodilatação evidente na gravidez normal. Diminuição da produção de ON pode, então, ter um papel relevante na fisiopatologia da PE (88, 112, 116).

Assim, se não há relação direta amplamente estabelecida entre ON e fisiologia da gestação ou fisiopatologia da PE, é indubitável que o ON desempenha papel importante no mecanismo e na modulação dessas situações (15).

3 Mensuração do ON circulante e gestação

A mensuração do ON produzido e de sua atividade, pela instabilidade já descrita, é realizada de maneira indireta. Dosagens mais ou menos sofisticadas são efetuadas, desde técnicas de biologia celular e de imunocitoquímica, passando pela avaliação dos níveis intracelulares ou urinários de monofosfato 3', 5'cíclico de guanosina (GMPC), chegando à dosagem de nitrito, nitrato inorgânico e citrulina (48, 85). Nitrato inorgânico é o metabólito final, estável, do ON e pode ser medido no soro ou na urina, como índice de produção de ON. A citrulina, por sua vez, é produzida juntamente com o ON, a partir da ação das ON sintases e constitui, também, possível marcador para a produção de ON. Há, ainda, possibilidade de dosagem de nitrito no plasma (encontrado em quantidades menores que o nitrato). Em água, ultrafiltrado e plasma, o ON é oxidado a nitrito (que é estável por várias horas) No sangue total, entretanto, nitrito é rapidamente convertido a nitrato (48, 85, 109). Investigadores têm usado o índice nitrito/nitrato como marcador da produção de ON (48).

A partir da dosagem destes metabólitos da rota da L-arginina, muitos trabalhos têm tentado mostrar a relação entre produção deficiente de ON e PE. A busca do conhecimento desta rota leva os autores à mensuração dos mais variados produtos de degradação do ON, em animais de experimentação (27, 29, 98, 124) e em humanos (92, 111, 112, 116). Selligman et al. (112)

utilizaram a mensuração de nitrito e da atividade da enzima ON sintase para mostrar variação do ON em gestantes com PE. Outros estudos mostram a concentração de nitritos e nitratos no plasma de gestantes com PE e gestantes normotensas (92, 116). Monofosfato 3'-5' cíclico de guanosina (GMPc), também, tem sido utilizado na tentativa de determinar a atividade da rota de L-arginina-óxido nítrico (111).

A dosagem plasmática de L-arginina circulante já foi utilizada em algumas circunstâncias para avaliação nutricional de pacientes em diálise (104). No entanto, este dado apenas evidencia o montante de L-arginina à disposição da célula, no meio extracelular. O transporte desse aminoácido através da membrana pode sugerir a disponibilidade para o meio intracelular, que é onde ocorre a ativação da rota que chega à produção de ON.

Os estudos elaborados para identificar a produção de ON na DHGPE não têm apresentado resultados consistentes (84), como será visto em **Revisão Bibliográfica**. Alguns evidenciam redução da síntese de ON nesta situação. Selligman et al. (112) relataram diminuição dos níveis séricos de nitritos em pré-eclâmpticas, quando comparados aos de mulheres normotensas. Begum et al. (15), utilizando mensuração de nitrato/nitrito na urina, avaliaram gestantes normais e gestantes com PE, observando excreção urinária diminuída em gestantes com PE .

4 Transporte de Membrana Celular

A célula é a unidade funcional de todos os organismos vivos e cada célula é cercada por uma membrana plasmática. Esta membrana é seletivamente permeável, contendo proteínas especializadas no transporte de substâncias para dentro e para fora, de maneira a manter adequado equilíbrio

com o meio. Algumas propriedades da membrana dependerão das diferentes funções especializadas da célula (2, 38, 55, 99). Estas propriedades poderão estar alteradas em diferentes doenças, ajudando a identificá-las adequada e, talvez, precocemente. Situações como hipertensão arterial, uremia e transplante renal têm sido estudadas, evidenciando disfunções celulares e defeitos no transporte de membrana, capazes de sugerir participação na patogênese dessas entidades (38, 39, 82, 94, 99).

A membrana celular é a barreira que controla a passagem de moléculas entre a célula e seu meio. Esta função de barreira é crucial para permitir que a célula mantenha a concentração interna de solutos, que é diferente do compartimento extracelular. Ela é composta de uma camada lipídica, na qual as proteínas estão embebidas junto com pequena quantidade de carboidratos, tendo uma grande quantidade de funções, além de barreira física. Permite o transporte seletivo de substratos, promove a transmissão de sinais químicos e provê um ambiente adequado às funções intracelulares (2, 38).

Transporte de íons inorgânicos e pequenas moléculas orgânicas, através da camada lipídica, é realizado por proteínas especializadas, cada qual com responsabilidade de transferir um íon específico, molécula ou grupo de íons e moléculas. As células podem transferir macromoléculas e mesmo grandes partículas através de suas membranas, mas o mecanismo envolvido, na maioria dos casos, é diferente. A presença de sistemas de transporte especializados possibilita que as células estabeleçam ajustes homeostáticos, quando das mudanças do meio externo e interno (38, 99).

A passagem através da membrana celular ocorre por dois processos básicos: *difusão* (também chamado de *transporte passivo*) e *transporte ativo*. Embora existam variações desses dois mecanismos básicos, difusão é a passagem de substâncias - molécula a molécula - pelos espaços

intermoleculares da membrana ou em combinação com uma proteína transportadora (figura 3). A energia que produz a difusão é a do movimento cinético da matéria. Nos mecanismos de transporte ativo, há exigência de uma fonte adicional de energia para criar e manter gradientes iônicos, permitindo que a célula ajuste seu meio interno (2, 55).

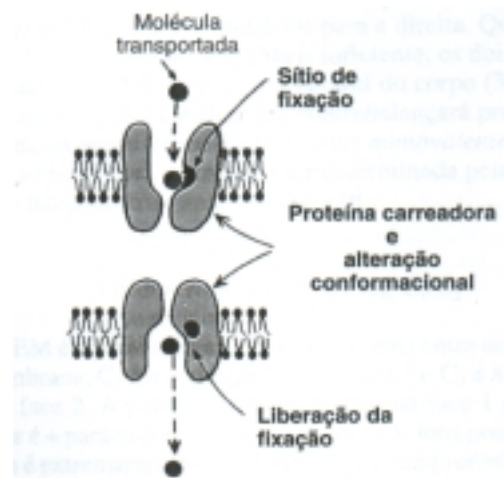


Figura 3 - Mecanismo postulado para a difusão facilitada (55)

Transporte passivo pela membrana pode se dar por difusão simples ou facilitada, como ilustra a figura 4. Na difusão simples, a passagem ocorre pelos espaços intermoleculares da membrana, por movimento cinético das moléculas ou íons, sem necessidade de fixação a proteínas da membrana. A difusão facilitada exige a interação de proteína transportadora e diferença de gradiente. L-arginina é transportada por difusão facilitada (9, 31, 82).

O processo pelo qual um sistema de transporte transfere moléculas através da membrana envolve um transportador com sítios específicos para essa molécula. Quando todos os sítios estão ocupados e todos os carregadores saturados, a taxa de transporte, através da membrana, é máxima para esta

molécula, e a essa taxa denominamos V_{\max} . Em adição, cada carregador tem uma característica de ligação, constante com seu substrato, denominada K_M . O K_M é igual, para uma determinada concentração de substrato, ao valor encontrado quando a taxa de transporte atinge metade do seu nível máximo: K_M é a constante de meia saturação (2, 30, 31, 38).

Os processos de transporte facilitado transmembrana ocorrem através de proteínas. No caso da L-arginina, tem-se dois sistemas de transporte estabelecidos: y^+ e $y^+ L$. A função destes transportadores pode ser avaliada de forma análoga à função de enzimas. Emprega-se cinética enzimática através da fórmula de Michaelis-Menten (30, 31, 36).

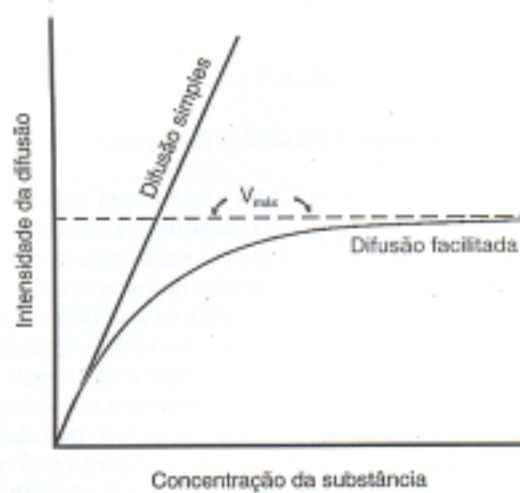


Figura 4 - Concentração de uma substância e capacidade de difusão através de membrana, onde ocorre difusão simples e difusão facilitada. A linha tracejada mostra o V_{\max} (55)

Alterações de permeabilidade da membrana celular já foram sugeridas na PE, mas nada definitivo existe sobre a natureza das mudanças e da relação destas com a fisiologia da gestação ou a fisiopatologia da PE (43, 59, 125).

5 Este estudo

Se HA, na gestação, está entre as causas mais comuns de morbidade e mortalidade materna e fetal, se os mecanismos fisiopatológicos da PE são desconhecidos e se não há um indicador precoce desta situação, continua-se carente de investigação e em busca do conhecimento.

Durante a gravidez, profundas mudanças ocorrem na circulação materna. A gravidez normal é caracterizada por redução na resposta da vasculatura aos vasopressores. Tem-se suspeitado, cada vez mais, que a PE é uma síndrome relacionada à disfunção do endotélio (120). Ao exame histológico, o aumento de volume das células endoteliais e a vacuolização do citoplasma são considerados patognomônicos da forma de PE sem fatores predisponentes conhecidos (“endoteliose”) (22, 89, 122).

Muito tem se especulado a respeito da participação do ON na fisiopatologia da PE. ON é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, sob ação das ON sintases, através da rota metabólica denominada “rota L-arginina-óxido nítrico” (figura 2). No entanto, são escassas as informações a respeito do substrato do ON - L-arginina - na PE, e a respeito do transporte deste aminoácido através da membrana celular (informação importante, já que a produção de ON ocorre dentro da célula).

Assim, o projeto foi delineado com o propósito de trazer informações sobre o assunto. Tornou-se possível, em hospital (São Lucas da PUCRS),

onde a gravidez de alto risco é freqüente e com o uso da tecnologia para avaliar transporte de membrana celular.

A escolha do aminoácido L-arginina deveu-se à existência de uma linha de pesquisa, no curso de pós-graduação, ao fato desse aminoácido ser precursor da síntese de ON e ao reconhecimento crescente de que o ON participa nos mecanismos fisiopatológicos da HA.

O estudo testa a hipótese de que, na DHGPE, o transporte de L-arginina, através da membrana celular, está diminuído, oferecendo menos substrato à ON sintase.

II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

HA durante a gravidez é uma situação clínica em que, tanto na avaliação como conduta, exige conhecimento diverso do utilizado na HA de pacientes não grávidas. Além da HA primária ou secundária que a paciente pode levar para a gestação, há uma específica da gravidez, que é a PE - complicação com riscos maternos e fetais diversos dos inerentes à HA. Pode-se manifestar de forma silenciosa ou sintomática e ameaçadora, por convulsão (eclâmpsia) e hemólise, disfunção hepática e plaquetopenia (síndrome HELLP).

A última década testemunhou avanços significativos no conhecimento da HA, entretanto a doença hipertensiva da gestação segue com lacunas em seu entendimento, fazendo com que não se a enfrente com menor susto que há duas décadas. A procura de marcadores precoces para o diagnóstico de PE está entre as motivações mais caras ao estudo deste assunto (131).

Com as crescentes pesquisas sobre a importância do endotélio como regulador da resistência vascular periférica, a busca de maior entendimento da fisiopatologia da PE ganhou novo impulso (120, 122, 127). A investigação dos fatores relaxantes e constritores, derivados do endotélio, permite que se

veja a possibilidade de elucidar aspectos da fisiopatogenia dessa doença gestacional.

A **Revisão Bibliográfica** pretende informar sobre aspectos fundamentais da PE, revisar o papel do ON na fisiologia da gestação e na fisiopatologia da PE e, finalmente, comentar o transporte de membrana celular.

1 Pré-eclâmpsia

1.1 Classificação e características clínicas

A classificação da DHG na gravidez permanece suscitando dificuldades. Há múltiplas classificações, cada qual utilizando diferentes aspectos e justificativas de sua abordagem. Hipertensão induzida pela gestação, gravidez associada à hipertensão, gestose e toxemia estão entre os termos mais usados para descrever a doença que se discute como DHGPE (11, 108). Se denominada de PE, por que não usar este termo único para definir a hipertensão ocorrendo na gravidez? Porque isso levaria a dificuldades para separar a doença que inicia na gestação de outra que, mesmo apresentando-se de forma parecida, inicia antes e se agrava durante a gestação.

A confusão, em parte, ocorre por dificuldade em distinguir, por critérios clínicos, PE, hipertensão primária ou secundária, doença renal crônica e combinações de todas elas (11, 14). Esta dificuldade foi demonstrada de maneira clara pelos resultados de estudos de correlação clínico-patológica, em que foi usada biópsia renal como padrão de diagnóstico. Fisher et al. (40), comparando retrospectivamente o diagnóstico

clínico de PE leve e severa com a histologia em biópsias renais, encontraram lesões típicas de PE em somente 55 por cento das pacientes. As restantes não tinham lesão alguma ou mostraram nefrosclerose, glomerulonefrite crônica, nefrite intersticial ou outras doenças que lembram PE. Katz et al. (66), também, evidenciaram o erro, quando não acharam evidências histológicas de PE em 40 por cento das grávidas com doença renal prévia, que foram consideradas como casos de PE superposta à HA.

A revisão da literatura mostra estudos de grupos, geralmente não separados, tornando difícil evidenciar a forma de doença hipertensiva, se PE ou PES. Benigni et al. (16), realizando avaliação de baixas doses de ácido acetil-salicílico para prevenir síndrome de PE - que denomina de “hipertensão induzida pela gestação”- escolheram 11 mulheres previamente hipertensas e outras 22 com situações clínicas prévias que permitiam sugerir maior chance de ocorrência da síndrome. Spinillo et al. (117) selecionaram grupo de “primíparas com gestação simples (um só feto) que desenvolveram PE” (que não exclui a inclusão de hipertensas prévias). Chesley (22) sugere que sejam denominadas “pré-eclâmpticas” apenas gestantes”: 1) nulíparas; 2) com proteinúria abundante; 3) história confiável de “normalidade” cardiovascular e renal, ou melhor, com acompanhamento posterior provando isso; 4) idade menor que 25 anos e 5) com hiperuricemia. Diz que esses critérios excluirão algumas pacientes com PE, mas exclui, também, o erro diagnóstico. Lembra que, embora idealmente, o diagnóstico deve ser sustentado por biópsia renal, isso não é prático e pode ser eticamente não aceitável. Smárason et al. (116), Nobunaga et al. (92) e Davidge et al. (28) usaram, como critério para confirmar o diagnóstico de PE, o acompanhamento pós-parto das pacientes. Revendo-as após o parto, determinaram a presença de doença renal ou cardiovascular prévia à gestação.

PE é associada a um achado histológico renal denominado “endoteliose glomerular”: o glomérulo está aumentado, com edema celular, mas sem hiper celularidade (7, 11, 113). O aumento do glomérulo se deve à hipertrofia das células endoteliais - em especial - e das mesangiais. Trombose e depósito de material fibrinóide subepitelial são descritos raramente (7, 11, 14, 68). Quando há superposição de síndrome de PE à doença prévia, os achados podem incluir desde lesão vascular por hipertensão até achados sugestivos de glomerulopatia prévia, como glomerulosclerose segmentar e focal (7, 14).

PE é *doença específica da gestação*, caracterizada por hipertensão, proteinúria patológica e edema, na maior parte das vezes, podendo se acompanhar de anormalidades na função hepática e na coagulação. Das muitas classificações em uso, a mais freqüentemente encontrada é sugerida pelo “Comitê de Terminologia” do “American College of Obstetricians and Gynecologists”, em 1972 (65), ratificada, em 1990, pelo “National High Blood Pressure Education Program Working Group”(HBPP) (11, 90):

.Hipertensão crônica: hipertensão presente antes da gravidez ou diagnosticada antes da 20^a semana de gestação, ou que persiste 6 semanas após o parto;

.Pré-eclâmpsia: hipertensão iniciando após a 20^a semana de gestação, usualmente, acompanhada por proteinúria e edema, em paciente previamente normotensa;

.Eclâmpsia: ocorrência de convulsões que não possam ser atribuídas a outras causas, em paciente com pré-eclâmpsia;

.Pré-eclâmpsia superposta a hipertensão crônica: grávida com hipertensão prévia, aumento de pressão arterial de pelo menos 30 mm de Hg de sistólica ou 15 mm de Hg da diastólica, acompanhado de proteinúria ou edema;

Hipertensão transitória: elevação da pressão arterial durante a gestação ou 24 horas pós-parto, sem sinais de PE ou HA pré-existente.

Poucas mulheres desenvolvem uma complicação da DHGPE, a síndrome *HELLP*: hemólise, elevação de enzimas hepáticas e redução do número de plaquetas. A síndrome *HELLP* contribui para o aumento da morbimortalidade da doença hipertensiva gestacional (11, 65).

Hiperuricemia, também, associa-se ao diagnóstico de PE, em especial, em nulíparas. É incomum o desenvolvimento de PE sem elevação do ácido úrico plasmático. Afirmam alguns autores que se deve duvidar do diagnóstico, se não ocorrer hiperuricemia (20, 90).

Apesar da dificuldade de classificação de gestantes em PE e PES, a gravidade parece ser maior em pacientes previamente hipertensas, justificando a tentativa de identificá-las. A paciente com PE (doença hipertensiva específica da gestação) tipicamente volta a controlar a PA duas a três semanas após o parto (65). Retrospectivamente, parece ser menos complicado classificá-las clinicamente: pacientes definitivamente hipertensas, com alterações hipertensivas de fundo de olho ou que, passadas seis semanas do parto, permanecem hipertensas ou com alteração do sedimento urinário, são as com doença prévia à gestação. Por outro lado, as que voltam a ser normotensas e com sedimento urinário normal, possivelmente tinham “PE”.

1.2 Dados Epidemiológicos

No Brasil, o coeficiente de morte materna, por complicações da gestação, do parto e pós-parto, é de 72 para cada 100.000 nascidos vivos ou 156/100.000, usando-se o fator de correção de 2,24, preconizado por Ruy de Laurenti, para correção de atestados de óbito mal preenchidos. Países como o

Canadá têm apenas 4 óbitos por 100.000 nascidos vivos. A Organização Mundial de Saúde considera aceitável um índice entre 10 e 20 mortes para cada 100.000 nascidos vivos. DHG responde por 33,1 por cento do total de óbitos maternos em nosso país (4). A Equipe de Informação em Saúde de Porto Alegre refere nove óbitos maternos ocorridos por complicações hipertensivas, num total de 26 relatados no ano de 1995 (37).

Kaunitz et al. (67), ao estudarem causas de morte materna nos Estados Unidos, entre 1974 e 1978, num universo de 2475 mortes, relacionaram 421 como decorrência de doença hipertensiva.

A incidência de PE em nulíparas é variável, dependendo do critério utilizado e da população estudada. A incidência foi de 2,8 por cento em 5591 mulheres de Israel; 5,8 por cento entre 5878 mulheres da Escócia; 14,1 por cento entre 2434 mulheres da Austrália e 5 por cento, num estudo prospectivo, em 179 mulheres em Seattle (114). Vários estudos epidemiológicos têm justificado associações entre características demográficas maternas e risco de PE. É relatada incidência aumentada em mulheres com menos de 21 anos e mais de 35 anos de idade (22,65); em mulheres negras (90) e em mulheres obesas (113). Estudo prospectivo, multicêntrico, de Sibai et al. (114), indicou que a pressão arterial sistólica precocemente elevada na gestação é altamente preditiva de PE.

PE é aceita como uma doença essencialmente da primeira gestação. De acordo com Chesley (22), aproximadamente, 75 por cento das mulheres com PE são nulíparas. Quando ocorre em gestações subseqüentes, tende a se apresentar de maneira menos severa. Nulíparas são seis a oito vezes mais suscetíveis que multíparas (1, 3, 23, 33, 65, 129). Ocorre com mais freqüência em extremos da idade reprodutiva, com fetos múltiplos, mola hidatiforme, hipertensão ou diabetes prévias (5, 7, 22). A incidência de

desordens hipertensivas da gestação foi demonstrada em 28 por cento das mulheres cujas filhas desenvolveram PE, comparada com 13 por cento daquelas cujas filhas tiveram gestação normal (129). Parece, também, haver predisposição genética, já que é descrita associação de PE e HLA-DR4 (1, 12).

A análise dos estudos epidemiológicos sugere que a presença de fatores predisponentes possa ser mais importante que o aumento da pressão arterial por si (5, 23, 65).

Friedman e Neff (45) estudaram 38636 grávidas, encontrando aumento na taxa de mortalidade fetal, quando a PAD estava acima de 84 mm de Hg, em qualquer momento da gestação. Estes achados estão de acordo com Sheehan (113), que descreveu muito baixa morbi-mortalidade na PE, quando os níveis pressóricos, sistólicos e diastólicos não ultrapassaram 135 e 145 mm de Hg, respectivamente.

Page e Christianson (96) relataram aumento na mortalidade perinatal e crescimento intra-uterino retardado, quando a pressão arterial média excedia 90 mm de Hg no 3^o trimestre da gestação.

Há poucos estudos sobre a influência da gestação na pressão arterial basal. Medidas iniciais são, usualmente, obtidas depois da 8^a semana de gestação ou quando a paciente apresenta sintomas que sugiram elevação da PA. Lutzky (78), em trabalho utilizando monitorização ambulatorial da PA em gestantes normais, descreve pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) mais elevadas no terceiro trimestre da gestação, em relação as dos dois primeiros trimestres.

MacGillivray et al. (80) relataram o acompanhamento de 226 gestantes nulíparas: verificou-se a diminuição dos níveis pressóricos sistólicos e diastólicos, atingindo seus valores menores próximo à 20^a semana de

gestação. A partir daí, a pressão arterial elevou-se até próximo ao termo, atingindo níveis semelhantes ao pós-parto.

É importante lembrar que a prática atual nos Estados Unidos - de onde se tem grande parte dos dados - é a de considerar a 5ª fase de Korotkoff para pressão arterial diastólica. Na Austrália e Reino Unido, a 4ª fase é considerada para a mesma medida (20). O diagnóstico de HA, na gestação, adotado pelo HBPP (90), é de valores iguais ou maiores que 140 mm de Hg de sistólica e 90 mm de Hg de diastólica, ou aumento de, no mínimo, 30 mm de Hg na sistólica e 15 mm de Hg na diastólica, em relação aos valores médios observados antes da 20ª semana. Também, é recomendado pelo HBPP o uso da 5ª fase de Korotkoff para se anotar a PA diastólica, pelo método auscultatório.

1.3 Patogênese

Fatores de risco e evolução da PE têm sido convenientemente estudados. Através da avaliação das conseqüências, alguns mecanismos já são conhecidos, como sensibilidade aumentada a angiotensina II (50). O que se desconhece é a causa, o mecanismo inicial que desencadeia esta situação tão cheia de nuances e tão grave para o encaminhamento da gestação.

A DHGPE é caracterizada por diminuição do volume plasmático, aumento da resistência vascular periférica e resposta pressora aumentada à ação da angiotensina II. Há ativação do sistema de coagulação e o fluxo sanguíneo reduzido leva a isquemia relativa no rim, fígado, cérebro e placenta (7, 13).

Desde 1958, a hipótese de que a doença inicia por reduzida perfusão placentária não foi desmentida. Hoje, a especulação está em torno de um

defeito primário da segunda onda de invasão trofoblástica, em torno da 22^a semana gestacional. Usualmente, a implantação do embrião é seguida pela migração das células trofoblásticas para dentro da parede das artérias espiraladas uterinas. Esses vasos perdem sua camada muscular e tornam-se condutos passivos que servem para acomodar aumento de até dez vezes no volume sanguíneo uterino. Isto leva à queda da resistência periférica e da PA. Na DHGPE, haveria falha neste processo e o aumento de PA levaria a lesões chamadas de “aterose aguda”, resultando em fluxo sanguíneo placentário diminuído (7, 25, 65).

Investigações da imunidade humoral e complemento de pacientes com DHGPE sugerem a presença de anticorpos circulantes, dirigidos às células trofoblásticas, glicoproteínas amnióticas e a uma glicoproteína componente da membrana do trofoblasto e glomérulo renal (12, 32). Anormalidades na coagulação parecem ser fenômeno fisiopatológico característico, mas existem controvérsias quanto à sua extensão e frequência. A contagem de plaquetas pode estar diminuída. Testes de atividade da coagulação, como tempo de protrombina, de tromboplastina parcial e níveis de fibrinogênio, permanecem normais, mas testes mais sensíveis parecem estar alterados. Foi descrito que os níveis de antitrombina III podem estar alterados semanas antes da manifestação de DHGPE (7, 32).

A vasodilatação da gravidez normal ocorre apesar dos 50 por cento de aumento do volume circulante e elevação do débito cardíaco. Gant et al. (50), em 1973, já reconheciam que a circulação materna é relativamente pouco responsiva a angiotensina II (A II). Estudos em animais dão sustentação a essa idéia e o consenso é que, na gestação, a redução da resposta vascular a AII não é exclusiva, mas ocorre, também, a outros agonistas vasoconstritores (12, 13, 119).

A hipótese de que a vasodilatação periférica e a redução da resposta vasoconstritora, na gravidez, resultem de aumento da síntese de prostaciclina (PGI_2), derivada do endotélio ou ON, tem sido bastante investigada (71). Sabe-se que a administração de indometacina (inibidor das prostaglandinas) aumenta a resposta vascular de mulheres grávidas à A II. Tromboxane A_2 (TXA_2), um vasoconstritor que aumenta a agregação plaquetária, também, está aumentado na gestação normal, mas o balanço entre TXA_2 e PGI_2 é negativo para TXA_2 (101).

Manifestações da PE na pressão arterial e coagulação têm sido relacionadas a um desequilíbrio entre produção de PGI_2 e TXA_2 , resultando em deficiência de PGI_2 . As causas da alteração do metabolismo das prostaglandinas são pouco conhecidas. Hipóteses sugerem a possibilidade de que aumento de peroxidases circulantes lesariam o endotélio, maior fonte de produção das prostaciclina (7).

Embora com alguma controvérsia, o papel central da placenta na PE permanece sem disputa. Este fato é realçado pela pronta correção da desordem logo após o parto e a alta incidência de PE em mulheres com mola hidatiforme, bem como em mulheres com aumento da massa placentária (gestações com múltiplos fetos). A perfusão reduzida da placenta estimula a produção de fatores que têm acesso à circulação, dando início à doença materna (7, 25, 101). Mais recentemente, têm-se cogitado de que o alvo desses fatores circulantes seja o endotélio vascular (106,107,122). No endotélio, há redução da síntese de substâncias vasodilatadoras e aumento na liberação de vasoconstritores e pró-coagulantes, resultando em vasoconstrição aguda e aumento da agregação plaquetária. O dano à barreira endotelial pode levar a aumento de permeabilidade vascular, predispondo à congestão pulmonar. Evidências de disfunção endotelial são múltiplas e

incluem endoteliose glomerular (lesão peculiar de PE), presença no soro de numerosos produtos celulares do endotélio, representados por endotelina, fibronectina celular e fator de von Willebrand, além de reduzida síntese de prostaciclina (68, 101).

Esta progressiva eleição da lesão endotelial, como alvo das desordens na PE, tem permitido cada vez mais o estudo dos fatores vasoativos do endotélio: relaxantes (ON, PGI₂ e Fator hiperpolarizante derivado do endotélio) e constritores (endotelina, TXA₂, A II e radicais livres) (64, 86, 126).

2 Óxido nítrico, gestação e transporte de membrana

ON, sintetizado pelo endotélio vascular, é importante para a regulação do tono vasodilatador e controle da PA (32, 44, 71). Estudos prévios têm mostrado que a redução da síntese de ON contribui para a disfunção vascular que caracteriza muitas doenças, incluindo hipertensão experimental em animais e hipertensão essencial no homem (32, 44, 64, 79, 105). Alterações na atividade da rota *L-arginina* - *óxido nítrico*, nesses estudos, têm sido sugeridas, baseada na resposta do fluxo sanguíneo regional, concentração de L-citrulina, nitrato e nitrito no sangue ou urina e monofosfato guanósínico (GMP) cíclico. Esta resposta é observada para agentes que estimulam (acetilcolina) ou inibem (análogos da L-arginina) a produção de ON (44, 57, 73, 97).

Weiner et al. (124) mostraram que o relaxamento de artérias uterinas isoladas de porcos da Índia, induzido por acetilcolina, não dependia somente de um endotélio intacto, mas também de um composto nitroso capaz de relaxar a musculatura lisa. Identificando o óxido nítrico, passou-se a

examinar os efeitos da gravidez e dos esteróides sexuais sobre a atividade da NOS “cálcio dependente” e “cálcio independente”. Conrad e Vernier (27) evidenciaram que os níveis plasmáticos e a excreção urinária de GMP cíclico aumentam na gestação de ratas. Subseqüentemente, estes pesquisadores mostraram que há um aumento na excreção urinária de nitritos e nitratos e que a síntese de ON está aumentada na gravidez. Deng et al. (29) avaliaram a excreção urinária de 24 horas de nitritos e nitratos em ratas Sprague-Dawley grávidas, encontrando valores 3 a 4 vezes aumentados, comparadas a de ratas virgens. Podjarni et al. (98) mostraram, também, aumento significativo de nitritos e nitratos na urina de ratas gestantes Wistar, quando comparadas a ratas virgens, controles.

Williams et al. (127) investigaram a contribuição do ON na vasodilatação, durante a gestação normal. Mediram o efeito da inibição da ON sintase no fluxo sanguíneo da mão durante a gestação. Usaram pletismografia e infusão de L-NAME - análogo da L-arginina e inibidor da ON sintase. Mostraram que houve aumento de PA nas gestantes, comparadas a não gestantes.

Em estudo comparativo entre 26 gestantes normais e 26 não gestantes saudáveis, Selligman et al. (112) evidenciaram níveis séricos de nitrito significativamente mais altos no grupo de gestantes. Nobunaga et al. (92) estudaram a concentração de nitritos e nitratos no plasma de 323 gestantes normotensas. Obtiveram concentração plasmática significativamente mais elevada, quando as compararam com 70 não gestantes sadias, sugerindo maior produção de ON na gestação. Isto deixa aberta a possibilidade de que o ON possa contribuir para a vasodilatação materna e para o relaxamento uterino. Boccardo et al (19) compararam oito gestantes normais e oito não gestantes normais, medindo GMPc plasmático e síntese plaquetária de ON,

auxiliados pela medida da conversão de L-arginina em citrulina e GMPc intracelular. Concluíram que os níveis sistêmicos de GMPc estão aumentados em gestantes normais e que não são originários das plaquetas. Smárason et al. (116), ao avaliarem 20 gestantes normais, comparando com 12 não gestantes, não encontraram diferença significativa na dosagem de nitrito sérico entre os dois grupos.

Na gestação normal de animais de experimentação e de seres humanos, a maioria dos estudos mostra elevação dos níveis plasmáticos e urinários de nitritos e nitratos, bem como de GMPc. Isto sugere que o ON tenha um papel importante na vasodilatação da gestação normal.

Cameron et al. sugerem correlação entre síntese de ON - determinada pelos níveis de nitritos e nitratos urinários, com níveis de PA sistólica em mulheres hipertensas (7). Selligman et al. (112) acharam correlação inversa entre PA sistólica, PA diastólica e níveis séricos de nitrito em pacientes pré-eclâmpticas. Schneider et al. (111) observaram concentração plasmática de GMP cíclico aumentada na PE e diminuição com o controle da PA. López-Jaramillo et al. (74) descreveram como efeito do uso de hidralazina alterações na dosagem de GMPc plasmático.

Orpana et al. (95) isolaram células endoteliais de veias umbilicais de pacientes com PE e de gestantes normais. Mostraram que a produção máxima de ON “cálcio dependente” não foi diferente nos dois grupos. No entanto, a produção cumulativa de ON foi significativamente menor nas células derivadas de gestantes com PE. Boccardo et al. (19) mostraram GMPc plasmático elevado em gestantes normais e gestantes pré-eclâmpticas, quando comparadas a controles não gestantes. Não houve diferença entre gestantes normais e pré-eclâmpticas. Não houve associação de PE com alterações na síntese “feto placentária de ON”. Silver et al. (115) não acharam diferença

nos níveis circulantes de nitratos e nitritos em pré-eclâmpticas severas, comparadas com mulheres normais.

Selligman et al. (112) relataram diminuição dos níveis séricos de nitritos em pré-eclâmpticas, quando comparados aos de mulheres normotensas. Begum et al. (15), utilizando mensuração de nitrato/nitrito na urina, avaliaram 24 gestantes normais e 12 gestantes com PE. Observaram excreção urinária diminuída em gestantes com PE.

Smárason et al. (116) analisaram níveis denitrato sérico em mulheres com PE. As concentrações de nitrato foram significativamente aumentadas, quando comparadas as de mulheres gestantes saudáveis, pareadas por idade para o estudo. Nobunaga et al. (92), avaliando 23 gestantes com PE, verificaram que os níveis de nitratos e nitritos plasmáticos foram significativamente maiores nestas pacientes, quando comparadas a grupo controle de não gestantes normais, não gestantes hipertensas e gestantes normotensas. Nesse estudo, o reparo a ser feito é o pequeno número de hipertensas não gestantes, que dificulta a avaliação deste grupo. Davidge et al. (28), usando concomitantemente dosagem de nitratos/nitritos plasmáticos e urinários, sugerem diminuição da produção de ON em mulheres com PE, comparadas com gestantes normais. Seus resultados mostram níveis plasmáticos não diferentes e urinários diminuídos. Seriam os níveis urinários expressão da produção de ON ou de diminuição na excreção renal em pacientes com PE? Schneider et al. (111) analisaram 16 gestantes com PE e 16 gestantes normais, pareadas para idade gestacional. Verificaram níveis séricos de GMPC significativamente aumentado nas mulheres com PE. Baker et al. (10) compararam o efeito, "in vitro", em plasma de mulheres com PE e de mulheres gestantes normais. Verificaram que a exposição de cultura de células endoteliais à plasma de pacientes com PE resultou em aumento maior

da produção de ON e da atividade da ON sintase, em comparação a exposição à plasma de gestantes normais.

Jones e Poston (61) observaram que a produção de ON não parecia desempenhar papel importante no controle da contratilidade da musculatura lisa uterina humana a termo ou pré-termo, fora do trabalho de parto. Okutomi et al. (93) avaliaram gestantes normais que tiveram parto cesariano com anestesia epidural e 17 com parto vaginal. A dosagem de nitrito foi comparada antes e depois da gestação. Os valores após a gestação diminuíram significativamente, embora ainda fossem maiores do que os controles fora da gestação. Ford et al. (42) estudaram a resposta de vasodilatação venosa à N^G -monometil-L-arginina. Verificaram efeito constritivo no puerpério imediato e não constritivo 12 semanas depois.

Nobunaga et al. (92) não encontraram relação entre nível plasmático de nitrato/nitrito e severidade da PE. Não houve, também, relação significativa em gestantes com hipertensão prévia. Schneider et al. (111) não encontraram diferença no nível plasmático de GMPc de pacientes com PE, comparado ao das que apresentaram síndrome “HELLP”. Dados de Silver et al. (115) - que dosaram nitrato/nitrito plasmático - não evidenciaram redução desses metabólitos do ON em pacientes que desenvolveram PE severa.

Helmbrecht et al. (58) provocaram síndrome semelhante à PE em ratas Sprague-Dawley, inibindo a ON sintase e revertendo as alterações por tratamento com L-arginina. Koifman et al. (70) sugeriram melhora do desempenho cardíaco por infusão venosa de L-arginina, em pacientes com insuficiência cardíaca moderada. He et al. (57) submeteram ratos “Dahl-Iwai sensíveis” (que desenvolvem HA com dieta rica em sal) ao uso de cloreto de sódio e, após o aumento da PA e resistência periférica, obtiveram normalização de fluxo sanguíneo cerebral, cardíaco, pulmonar, hepático,

esplênico, intestinal, muscular, cutâneo regional com suplementação de L-arginina. Chen e Saunders (21) observaram que administração de L-arginina, por longo tempo, previne hipertensão em ratas “Dahl sensíveis” expostas à dieta rica em sal.

Deng et al. (84) sugerem que deficiência crônica de ON pode levar à desarranjo na adaptação hemodinâmica da gravidez. Trataram um grupo de ratas grávidas com L-NAME (bloqueando a síntese de ON) e produziram hipertensão. Podjarni et al. (98), usando o modelo de hipertensão induzida pela gravidez em ratas com nefropatia por adriamicina, verificaram que houve incapacidade para adequar aumento da síntese de ON. A administração de L-arginina induziu importante melhora clínica. Liao et al. (71) trabalharam com ratas Sprague-Dowley adultas, nulíparas gestantes, não gestantes e machos normais submetidos à infusão de L-NAME. Verificaram aumento da PA sistólica em todos grupos, quando comparados a controles não tratados com L-NAME.

Em animais experimentais, tem-se demonstrado relação entre diminuição de ON e aumento da PA, além de retorno dos níveis pressóricos ao normal, se submetidos a dieta ou infusão de L-Arginina.

Estudos para identificar a produção de ON na PE não têm apresentado resultados consistentes. Alguns mostram redução, outros não modificação e terceiros sugerem aumento da síntese de ON. A dificuldade talvez esteja na comparação entre métodos de investigação não uniformes - medidas parciais dos metabólitos circulantes do ON -, fontes variadas para análise da produção de ON - dosagens séricas, plasmáticas ou urinárias dos metabólitos e dieta mais ou menos rica em L-arginina. Há, ainda, o viés de que, em muitos estudos, não há menção sobre o controle ou não da PA, ou do uso de anti-hipertensivos no momento das coletas para dosagem dos metabólitos de ON.

ON é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina sob ação das ON sintases, através da rota metabólica “*L-arginina-óxido nítrico*”, como já foi visto em **Introdução** (figura 2). O tratamento com L-arginina previne o desenvolvimento de hipertensão em animais predispostos e causa rápida redução na PAS e PAD, quando o aminoácido é infundido em seres humanos saudáveis e pacientes com HA primária (85). Ritz et al. (105) questionam o uso de L-arginina para diminuir a mortalidade cardiovascular dos pacientes em diálise.

Alterações no transporte de membrana celular têm sido sugeridas em alterações sistêmicas (7,35,83) e na gestação (43, 125). Milunpalo et al. (83) discutem atividade da bomba de sódio e potássio em eritrócitos e contratransporte de sódio e lítio em obesos. Weissberg et al. (125) relatam influxo de sódio aumentado em eritrócitos na gestação normal e, em especial, na gestação acompanhada de hipertensão. Forrester et al. (43), utilizando leucócitos como modelo, sugerem alteração na atividade da bomba de sódio em pacientes com PE.

Sabe-se, desde 1913, da permeabilidade da membrana de eritrócitos para aminoácidos (77). Fervenza (38) descreveu detalhado estudo de sistemas de transporte de membrana na insuficiência renal, usando como modelo o eritrócito. É conhecido, também, que os glóbulos vermelhos podem conter aminoácidos em concentrações mais altas do que o meio extracelular (35, 36, 121, 128). Ellory et al. (35) estudaram sistemas de transporte para aminoácidos em eritrócitos. Sistemas de transporte através da membrana celular podem acumular aminoácidos contra gradiente de concentração; as propriedades cinéticas não podem ser explicadas por difusão passiva (34, 35, 121). Winter e Christensen (128) descreveram dois sistemas saturáveis de captação de aminoácidos: um para aminoácidos neutros e outro, de baixa

capacidade, para alanina e glicina. Christensen et al. (24) descreveram sete sistemas de transporte para aminoácidos, mas somente cinco estão presentes em eritrócitos humanos. Os cinco sistemas, bem caracterizados e cineticamente analisados são: y^+ , ASC, gly, L e T. Um novo sistema, denominado y^+L , foi descrito, em 1992, em eritrócitos humanos, com alta afinidade por lysina e leucina (31).

O sistema y^+ é específico e carrega aminoácidos básicos, como L-lysina e L-arginina (59). É um sistema seletivo, de baixa afinidade e alta capacidade, que pode ser identificado em eritrócitos humanos e de carnívoros (115). O sistema y^+L , de alta afinidade e baixa capacidade, é o segundo sistema responsável pelo transporte de L-lysina e L-arginina (31).

L-arginina é transportada através pela membrana celular por difusão facilitada. Utiliza dois sistemas de transporte: y^+ e y^+L . O estudo do influxo de L-arginina, através da membrana celular, é o exame de um processo da rota metabólica L-arginina-óxido nítrico. Esse segmento da rota necessita maior investigação para avaliação dos mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos da HA.

III OBJETIVOS

1 Objetivo geral

Estudar o transporte total de L-arginina através da membrana celular em gestantes que desenvolveram a síndrome de pré-eclâmpsia.

2 Objetivos específicos

2.1 Comparar o transporte de L-arginina, através da membrana celular, em gestantes com síndrome de pré-eclâmpsia, gestantes normais e não gestantes.

2.2 Comparar o transporte de L-arginina, através da membrana celular, em gestantes com pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superposta à hipertensão arterial.

2.3 Comparar o transporte de L-arginina, através da membrana celular, em gestantes com síndrome de pré-eclâmpsia, durante a gestação e após o parto.

2.4 Analisar o transporte de L-arginina, através da membrana celular, em gestantes com síndrome de pré-eclâmpsia, classificadas segundo a gravidade do quadro clínico.

IV MATERIAL E MÉTODO

1 Delineamento

Estudo observacional, contemporâneo, transversal. Em um dos subgrupos da amostra, observações com delineamento longitudinal.

2 Definições para o estudo

Hipertensão Arterial (HA) - pressão arterial sistólica igual ou maior que 140 mm de Hg e ou pressão arterial diastólica igual ou maior que 90 mm de Hg, considerada as fases I e V dos sons de Korotkoff, respectivamente (90,91).

Síndrome de pré-eclâmpsia - HA acompanhada de proteinúria maior que 300 mg em 24 horas, após a 20^a semana de gestação (20).

Doença Hipertensiva Gestacional (DHG) - termo genérico utilizado para denominar o aparecimento de HÁ, de forma isolada ou não, durante a gestação.

Doença Hipertensiva Gestacional com Síndrome de Pré-Eclâmpsia (DHGPE) - DHG acompanhada de síndrome de Pré-Eclâmpsia.

Pré-Eclâmpsia (PE) - DHGPE de pacientes sem HA ou doença renal prévia à gestação.

Pré-Eclâmpsia Superposta (PES) - DHGPE de pacientes com HA prévia à gestação.

3 Pacientes

Foram analisadas mulheres entre 15 e 40 anos. Este grupo inclui gestantes que chegaram ao Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS com DHGPE e gestantes normais (GNO), além de grupo controle de mulheres com atividade no HSL, não gestantes, sem hipertensão (NG). Para fins de estudo, o grupo DHGPE foi dividido em dois subgrupos: gestantes com Pré-eclâmpsia (PE) e gestantes com PE Superposta à hipertensão crônica (PES), conforme figura abaixo.

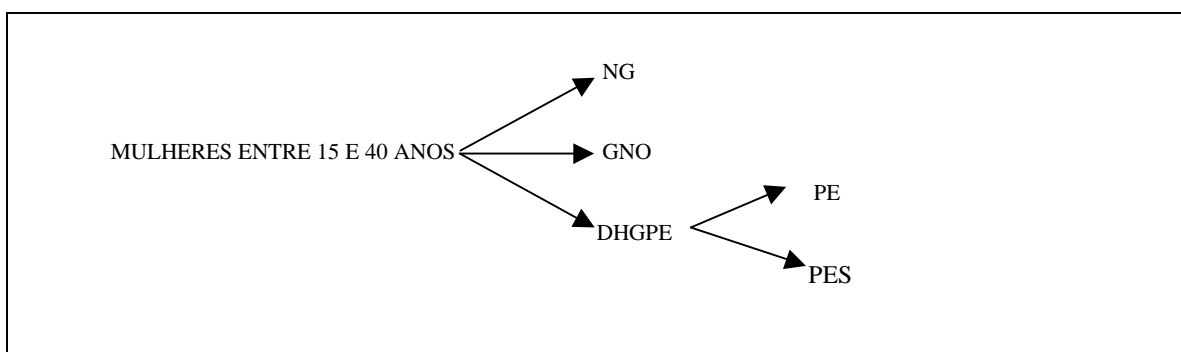


Figura 5 - Algoritmo do grupo de pacientes em estudo

3.1 Critério geral de inclusão das pacientes

Mulheres entre 15 e 40 anos que deram consentimento verbal e assinaram *Termo de Consentimento Pós-informado* (Anexo A), após informação dos riscos e propósitos do estudo. Trabalho aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa na Área da Saúde da PUCRS, antes da regulamentação da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. O seguimento da linha de pesquisa já está adequado à nova regulamentação.

3.2 Critérios de inclusão específicos nos grupos estudados

DHGPE - Mulheres em gestação de feto único, mais de 20 semanas de gestação, com HA, proteinúria maior que 300 mg em 24 horas, não diabéticas, sem história de nefropatia, doença de tireóide ou hepatopatia prévia à gestação e que não estavam em uso de hidralazina.

Este grupo foi subdividido em dois subgrupos, para uma segunda análise, após acompanhar a paciente no ambulatório de nefrologia ou obtendo dados em suas visitas pós-parto ao ambulatório de obstetrícia:

1-PE - Gestantes com DHGPE, sem história de HA prévia ou antes da 20^a semana de gestação, com fundoscopia normal e que retornaram aos níveis normais de pressão arterial após oito semanas do parto.

2-PES - Gestantes com DHGPE, com história e tratamento de HA prévia ou antes da 20^a semana de gestação, com fundoscopia evidenciando entrecruzamentos arteriovenosos patológicos ou que estivessem hipertensas e necessitando tratamento oito semanas após o parto.

GNO - Gestantes com 20 ou mais semanas de gestação, normotensas, não diabéticas, sem história ou tratamento de Hipertensão Arterial,

nefropatia, doença de tireóide ou hepatopatia prévia à gestação, com sedimento urinário normal e acompanhadas no ambulatório de Obstetrícia do HSL da PUCRS.

NG - Mulheres não gestantes, normotensas, não diabéticas, sem história ou tratamento de Hipertensão Arterial, nefropatia, doença de tireóide ou hepatopatia e urina sem glicosúria, hematúria ou proteinúria ao teste com fita.

Puérperas - Mulheres com DHGPE que interromperam a gestação e que coletaram a segunda amostra de sangue entre 48 e 72 horas, após o parto.

3.3 Critérios de exclusão após iniciado o estudo

No grupo DHGPE - Mulheres com proteinúria ou hematúria no exame químico da urina ou creatinina sérica igual ou maior do que 1mg/dL, oito semanas após o parto.

No grupo GNO - Mulheres com níveis pressóricos elevados na revisão ambulatorial, oito semanas após o parto.

Só foram excluídas pacientes dos grupos de gestantes. Como sua inclusão no trabalho se deu durante o período de gestação, a presença de doença renal prévia no grupo DHGPE poderia ter confundido o diagnóstico de pré-eclâmpsia. Além disso, níveis pressóricos normais na gravidez não excluem o diagnóstico de hipertensão prévia no grupo GNO. O grupo NG, composto de mulheres normais fora da gestação, tem critérios de inclusão que se esgotam em seu enunciado, já que não há uma situação transitória conhecida (como a da gestação nos outros dois grupos) que possa alterar a qualificação inicial desejada na escolha das pacientes.

Não foram consideradas para o estudo as pacientes com hipertensão crônica ou hipertensão transitória pela classificação do HBPP (56,61).

4 Procedimento

Avaliou-se o transporte de L-arginina através da membrana celular em gestantes que desenvolveram a síndrome de pré-eclâmpsia, em controles com gestação normal, e em mulheres não gestantes.

As gestantes incluídas no estudo submeteram-se a um protocolo (Anexo B) com dados de história, exame físico e exames laboratoriais de sangue e urina coletados após assinatura do *Termo de Consentimento Pós-informado*.

As variáveis analisadas foram idade, cor, peso, altura, grupo ABO e Rh, número de gestações, idade gestacional ao tempo da avaliação, idade gestacional ao tempo do parto, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, edema, creatinina sérica, proteinúria de 24 horas, proteinúria e creatininúria em amostra, índice de Goecke e Schwabe, V_{\max} e K_M .

A medida da pressão arterial foi realizada utilizando esfigmomanômetros aneróides, medindo no membro superior direito, considerando para valor sistólico o registro ao primeiro ruído auscultado dos sons de Korotkoff (fase I - quando se iniciam a ouvir os sons) e para valor diastólico o registro ao quinto ruído auscultado dos sons de Korotkoff (fase V- quando cessa a ausculta dos sons).

Para se obter dados quantitativos para edema, pontuou-se o infiltrado de um até quatro, conforme a extensão: tornozelo -1; tíbia -2; coxa -3; e generalizado -4.

Dosagens de creatinina sérica e urinária foram realizadas no laboratório do HSL, pelo método cinético/automação, e a proteinúria foi determinada por métodos turbidimétricos. Proteinúria e creatininúria foram colhidas em amostra do início da segunda micção da manhã e utilizadas para estimar a proteinúria de 24 horas, quando a coleta de toda urina de 24 horas não foi possível (52).

Os testes com fita, para exame químico da urina, foram realizados com fita diagnóstica “Combur 10 Test^R”.

Foi realizada avaliação clínica quanto à gravidade da doença gestacional das pacientes, a partir do índice de Goecke e Schwabe (63):

Score	0	1	2	3
PA sistólica	<140 mm de Hg	>140-160	>160-180	>180
PA diastólica	< 90 mm de Hg	>90-100	>100-110	>110
Proteinúria	< 1g	>1 a 3	>3-6	>6
Edema	Ausente	Tornozelo	Tibial	Generalizado

Score acumulado: leve(1 a 5); moderado(6 a 9); severo (10 a 12)

Figura 6 - Índice de gestose de Goecke e Schwabe

A avaliação do transporte de L-arginina, através da membrana celular, foi realizada no Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, conforme será descrito. No presente estudo, a captação total da L-arginina foi considerada como se realizada através de um sistema único de transporte. O eritrócito foi a célula utilizada como modelo de transporte celular, por constituir população homogênea de células, sem

espaço extracelular e que pode ser separada, fácil e rapidamente, por centrifugação.

Razões e métodos foram revisados por Harvey e Ellory em 1989 (56). A técnica permite o seguimento dos movimentos do aminoácido através da membrana.

Colhidos 5 a 10 mililitros (mL) de sangue em tubo de 20 microlitros (μ L). Seguiu-se centrifugação. Plasma e camada contendo leucócitos e plaquetas foram removidas por aspiração, separando-se os eritrócitos para o experimento.

Os eritrócitos foram lavados rapidamente, por 3 vezes, em solução salina (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, Glicose 5 mM, MOPS 10 mM com pH = 7,4) e colocados novamente em suspensão nessa solução com hematócrito variável, entre 0,06-0,20. As células foram mantidas a 4°C para diminuir o metabolismo celular e o transporte através da membrana.

Medidas de fluxo foram realizadas, incubando as células por três minutos a 37°C em solução de L-arginina, com as seguintes concentrações: 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 180, 200, 300 e 500 μ M. Todas as concentrações foram experimentadas em duplicata.

Os fluxos foram iniciados e interrompidos no gelo. Após incubação, as células foram submetidas à resfriamento por 3 minutos e, então, lavadas - livres do marcador extracelular - com solução de MgCl₂ (MgCl₂ 107 mM; MOPS 10 mM; pH = 7,4) gelada. O método permite seguir os movimentos do aminoácido através da membrana do eritrócito. Para detecção do influxo, L-arginina em solução foi marcada com carbono radioativo (¹⁴C). O erro devido à contaminação por radioatividade extracelular, após 3 lavagens sucessivas, é mínimo e não é necessário uso de marcadores do espaço extracelular.

As células foram lisadas pela adição de 0,5 mL de Triton-X a 0,1% e, após, adicionado 0,5 mL de ácido tricloroacético a 5% para precipitar proteínas. O sobrenadante forneceu a contagem da radioatividade intracelular, permitindo estimar a quantidade de L-arginina captada pela célula. O conteúdo de ^{14}C dos eritrócitos foi medido por cintilação líquida, num contador espectrofotométrico de cintilação β , PW 4540 PHILIPS, medindo-se também frascos marcados como padrão de referência da radiação.

A taxa de influxo total de L-arginina transportada foi calculada a partir da relação entre as contagens (cpm) emitidas pelo contador β , o volume de células e o tempo de incubação a 37°C . Os resultados apresentam-se em $\mu\text{mol}/\text{L}$ de células/ hora.

Os dados foram submetidos à equação cinética de Michaelis-Menten, considerando-se o influxo total de L-arginina para obter a capacidade máxima de influxo do aminoácido (V_{max}) e a constante de Michaelis (K_M). Os resultados foram obtidos com o uso do software Enzifitter (programa para análise função enzimática), como ilustra o Anexo C.

Foram realizadas quatro análises em relação ao transporte de membrana de L-arginina:

- 1-Avaliação do transporte de membrana nos grupos NG, GNO e DHGPE;
- 2-Avaliação do transporte de membrana nos grupos PE e PES;
- 3-Avaliação do transporte de membrana no grupo DHGPE durante a gestação e no puerpério precoce;

4-Avaliação do transporte de membrana no grupo DHGPE quanto à severidade do quadro clínico.

5 Análise estatística

Para os dados quantitativos foram calculados média, desvio padrão e mediana, quando necessário.

Na comparação entre grupos, utilizou-se análise de variância (Anova) com localização de diferenças significativas através do teste de Tukey. Nas situações de excessiva assimetria de dados, utilizou-se Anova não paramétrica de Kruskal-Wallis, com localização de diferenças através do teste específico de Dunn. O teste t de Student e o teste U de Mann-Whitney foram utilizados nas comparações direcionadas somente a dois grupos.

Para examinar as correlações lineares entre variáveis quantitativas, utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson, com sua significância determinada através de teste t . O coeficiente é dito *nulo* quando zero; *fraco* entre 0 – 0,29; *regular* entre 0,3 – 0,59; *forte* entre 0,6 – 0,89; *muito forte* entre 0,9 – 0,99 e *perfeito* quando igual a 1 (69).

Realizou-se teste de ajuste aproximado para o peso do efeito de uma correlação na comparação entre dois grupos, que consiste na multiplicação do coeficiente de determinação (γ^2) pela diferença absoluta encontrada entre os grupos (69).

Adotou-se, como nível de significância, α igual a 0,05.

O programa utilizado como banco de dados foi o *Microsoft Excel* e, na análise, utilizou-se o programa *SPSS* (Statistical Package for Social Sciences) *for Windows*.

V RESULTADOS

Foram analisadas 74 mulheres (NG=14, GNO=21 e DHGPE=39). Do grupo GNO, foram excluídas duas pacientes por manterem níveis pressóricos elevados, oito semanas após o parto. Do grupo DHGPE, foram excluídas oito pacientes: cinco eram hipertensas sem proteinúria na gestação e três permaneceram com proteinúria patológica, oito semanas após o parto.

Após as exclusões, o grupo para estudo foi de 64 pacientes, assim divididas: NG=14, GNO=19 e DHGPE=31. A comparação entre os 3 grupos constituiu a **primeira análise**.

A **segunda análise** centrou-se no grupo DHGPE. Este grupo foi dividido em 2 subgrupos: PE e PES (conforme definição em **Material e Método**). Das 31 pacientes, do grupo DHGPE, foram excluídas quatro porque se perderam dados do seguimento ambulatorial o que impediu sua classificação. Os grupos para análise ficaram assim constituídos: PE=13 e PES=14. A figura 7 ilustra com um algoritmo os grupos da primeira e a segunda análise.

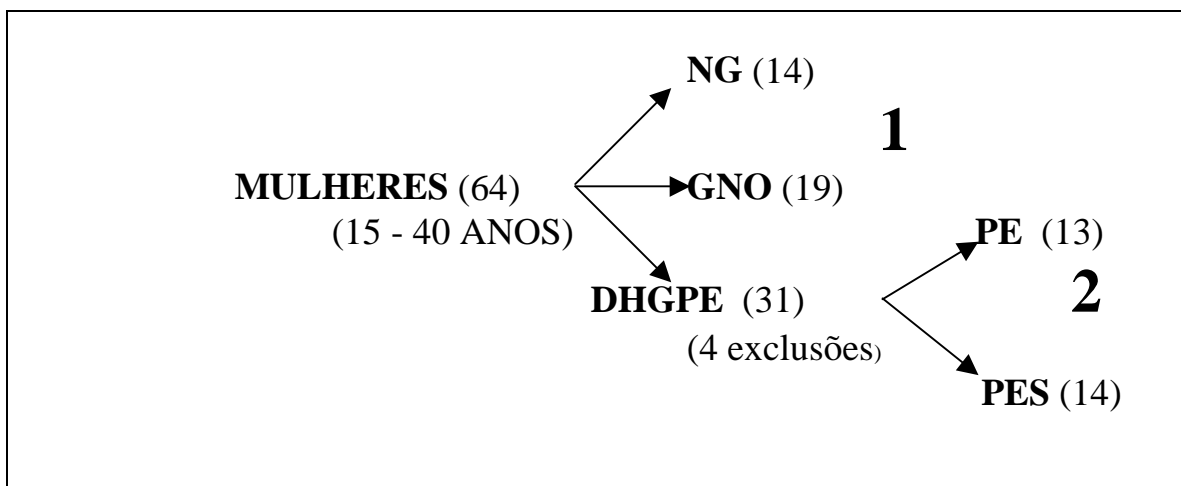


Figura 7 - Algoritmo dos grupos para a primeira e segunda análise

A **terceira análise** foi o acompanhamento de 15 gestantes com DHGPE. Nesta verificação, observamos pacientes antes e depois do parto, sem perdas de seguimento. O grupo para a terceira análise ficou com 15 pacientes.

A **quarta análise** realizou-se com 31 pacientes, classificadas quanto à severidade do quadro clínico, segundo classificação de Goecke-Schwabe (63). Foram classificadas como DHGPE moderada e severa 20 pacientes e como DHGPE leve 11. A figura 8 ilustra, com um algoritmo, os grupos da terceira e quarta análise.

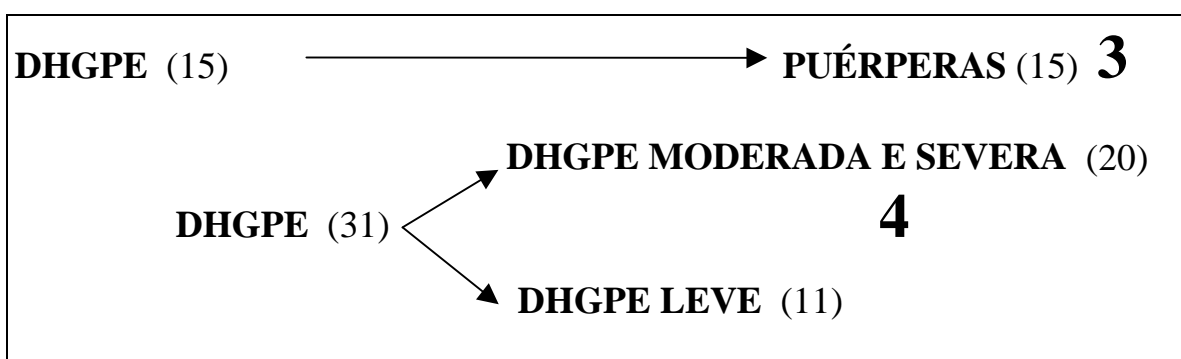


Figura 8 - Algoritmo dos grupos para a terceira e quarta análise

A seguir, as figuras dos algoritmos individuais das comparações, sucedidos das informações obtidas em cada uma das quatro análises, dispostos em tabelas e gráficos.

1 Avaliação do Transporte de L-arginina através da membrana celular nos grupos NG, GNO e DHGPE

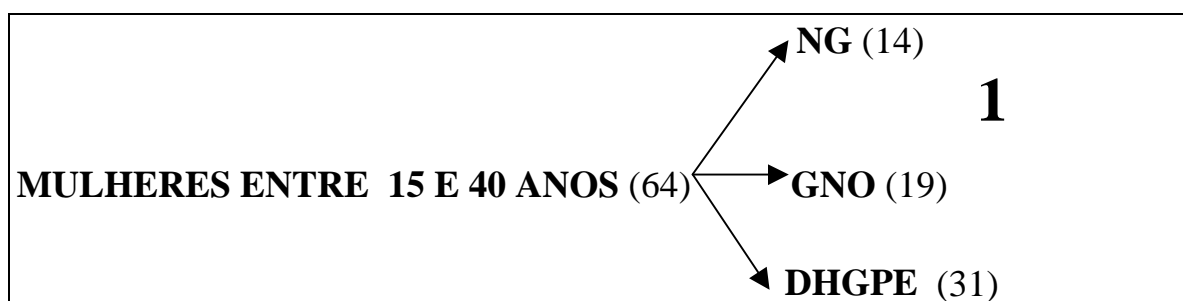


Figura 9 - Algoritmo da primeira análise

Comparamos os três grupos, inicialmente, quanto à idade, raça e idade gestacional na coleta de sangue para avaliação do transporte de L-arginina através da membrana de eritrócitos.

**TABELA 1
CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS**

	N	Idade (anos)	Raça Branca (n) e (%)	Raça Negra (n) e (%)	Idade Gestacional da coleta (semanas)
NG	14	26,2 ($\pm 4,5$)*	11 (78,6%)	3 (21,4%)	_____
GNO	19	22,6 ($\pm 3,5$)	15 (78,9%)	4 (21,1%)	33,9 ($\pm 3,6$)
DHGPE	31	25,8 ($\pm 6,8$)	24 (77,4%)	7 (22,6%)	31,9 ($\pm 4,3$)

*média (\pm desvio padrão)

**não houve diferença significativa entre os grupos para as quatro variáveis

A análise de variância e o uso de testes não paramétricos, para amostras independentes, evidenciaram não haver diferenças significativas entre os três grupos quanto à média de idade e raça. Também, não se verificou diferença significativa, comparando os grupos de gestantes (GNO e DHGPE), quanto à semana em que foi feita a coleta de sangue para avaliação do transporte eritrocitário.

TABELA 2

 V_{MAX} E K_M

NOS GRUPOS NG, GNO E DHGPE

	V_{max}^* ($\mu\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	V_{max}^{**} ($\mu\text{mol.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	K_M^* (μM)	K_M^{**} (μM)
NG	583,3 ^a ($\pm 390,7$)	533,9 ^a	83,8 ^a ($\pm 33,9$)	75,1 ^a
GNO	506,1 ^a ($\pm 403,6$)	317,4 ^a	57,3 ^b ($\pm 19,9$)	59,4 ^b
DHGPE	1011,4 ^b ($\pm 536,2$)	1118,4 ^b	63,5 ^b ($\pm 16,1$)	62,1 ^b
p^{***}	<0,001	0,001	0,003	0,011

*média (\pm desvio padrão)

**mediana

***letras índice diferentes representam grupos com diferença significativa ($p < 0,05$)

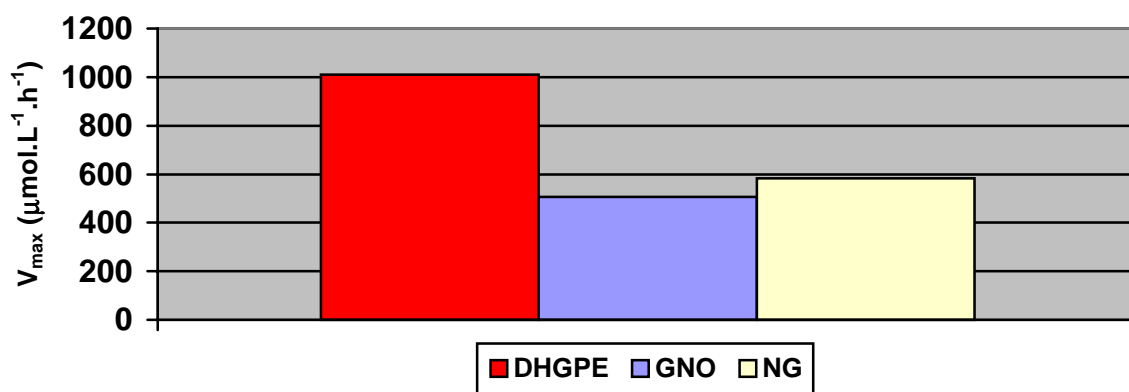


Gráfico 1 - Captação eritrocitária máxima de L-arginina nos grupos DHGPE, GNO e NG

A comparação dos três grupos (Tabela 2 e Gráfico 1) evidenciou que, para V_{\max} , houve diferença estatisticamente significativa entre NG e GNO, comparados a DHGPE e não para NG e GNO.

Como mostram a Tabela 2 e Gráfico 2, a diferença estatisticamente significativa verificou-se entre NG e os dois grupos GNO e DHGPE, e não entre GNO e DHGPE.

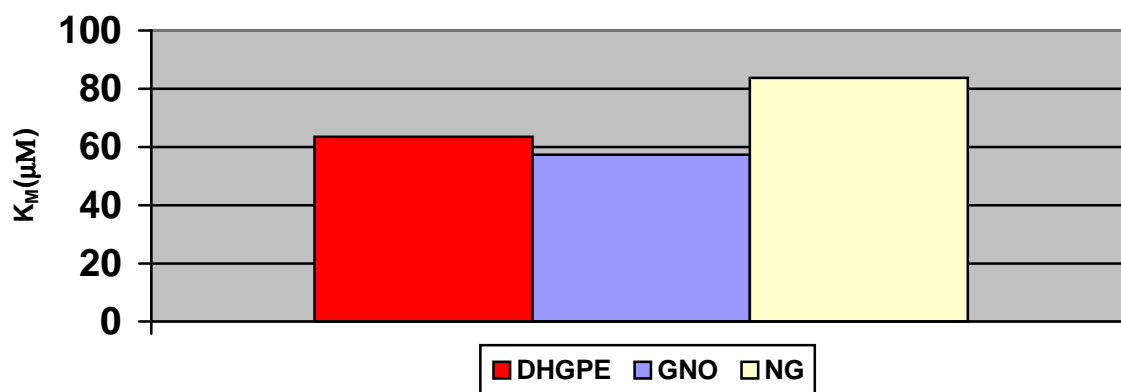


Gráfico 2 – Constante de meia saturação para os grupos DHGPE, GNO e NG

2 Avaliação do transporte de L-arginina através da membrana celular nos subgrupos PE e PES

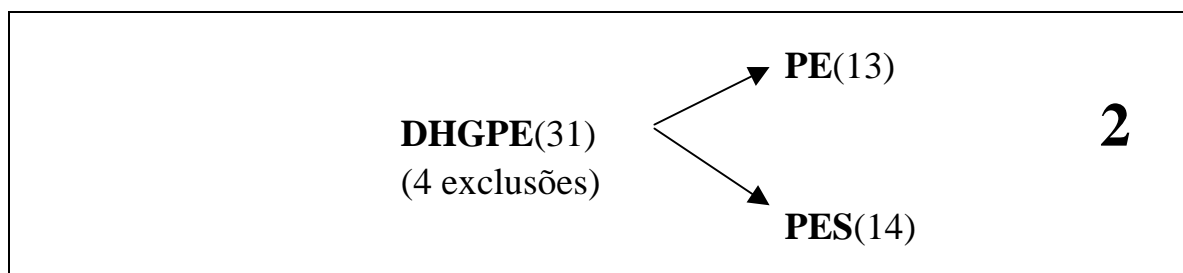


Figura 10 - Algoritmo da segunda análise

Inicialmente, foram caracterizados os subgrupos PE e PES (derivados de DHGPE) quanto à idade, raça, número de gestações, semana do parto, peso do neonato, índice de gravidade, presença de síndrome HELLP e idade gestacional na coleta de sangue para avaliação do transporte de L-arginina, como mostram Tabela 3 e 4.

TABELA 3
CARACTERÍSTICAS DOS SUBGRUPOS PE E PES

	N	Idade (anos)*	Raça Branca (n)	Raça Negra (n)	Nº de Gestações*	Idade Gestacional da coleta* (semanas)
PE	13	20,5**	10	3	1,5**	32
PES	14	30,4	10	4	2,6	30,6

*média

** $p < 0,05$ nas comparações dos grupos pelas variáveis assinaladas

TABELA 4
CARACTERÍSTICAS DOS SUBGRUPOS PE E PES

	N	Idade Gestacional do parto (semanas)	Peso do neonato (g)	Goecke-Schwabe	Síndrome HELLP(n)	Ácido Úrico sérico-mg/dL
PE	13	32,2*	1681,3	6,2	2	6,4
PES	14	33,3	1806	6,6	2	6,4

*média

** não houve diferença significativa entre os grupos para as cinco variáveis

Conforme observado nas tabelas 3 e 4, os subgrupos PE e PES não foram significativamente diferentes para raça, semana de gestação da coleta e do parto, peso do neonato, índice de Goecke & Schwabe, ocorrência de síndrome HELLP e ácido úrico sérico. No entanto, a diferença foi significativa quanto à idade ($p < 0,001$) e ao número de gestações ($p = 0,012$), que foram maiores no grupo PES.

TABELA 5
PAS, PAD, EDEMA E PROTEINÚRIA DE 24 HORAS NOS
SUBGRUPOS PE E PES

	PE (n=13)	PES (n=14)	P
PAS (mm de Hg)	157,7* (±14,2)	172,1 (±29,1)	0,101
PAD (mm de Hg)	103,8 (±7,7)	114,6 (±24,2)	0,248
Edema (1+a4+)	2,7 (±0,9)	2,4 (±0,9)	0,396
Proteinúria De 24 h (mg)	3701,7 (±3412,6)	4760,9 (±4393,8)	0,593

*média (± desvio padrão)

A Tabela 5 informa que, embora pareça haver diferença entre as médias de PA, não houve diferença entre os dois subgrupos para PAS, PAD, edema e proteinúria de 24 horas, quando usamos o teste *t* de Student para comparar médias. Devido à excessiva assimetria dos dados, comparamos as médias de proteinúria pelo teste não paramétrico *U* de Mann-Whitney e, outra vez, não houve diferença significativa.

TABELA 6
V_{MAX} E K_M NOS SUBGRUPOS PE E PES

	V_{max}* μmol.L⁻¹.h⁻¹	V_{max}** μmol.L⁻¹.h⁻¹	K_M* μM	K_M** μM
PE	660,4 (±478,5)	471,7	55,3 (±13,7)	56,9
PES	1270,1 (±461,7)	1209,5	74,2 (±12,1)	73,6
P	0,003	0,003	<0,001	0,001

*média ± desvio padrão

**mediana

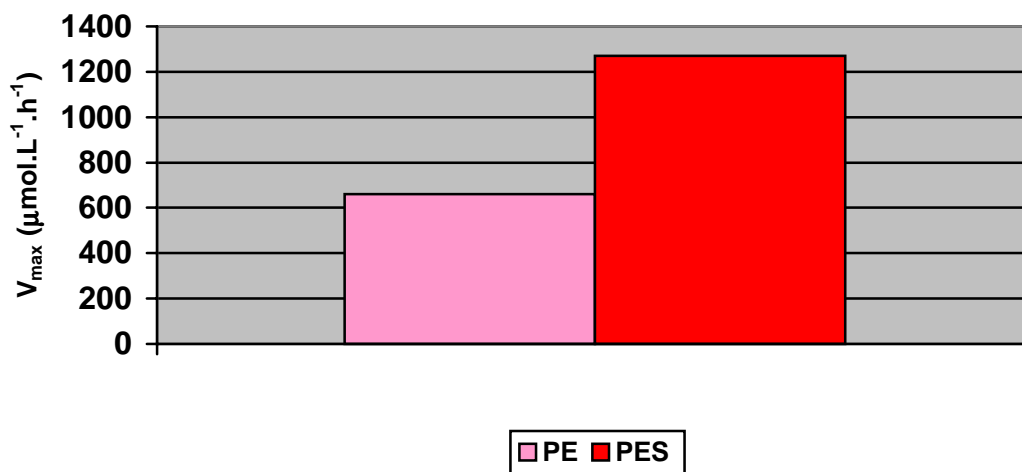


Gráfico 3 - Captação eritrocitária máxima de L-argina nos grupos PE e PES

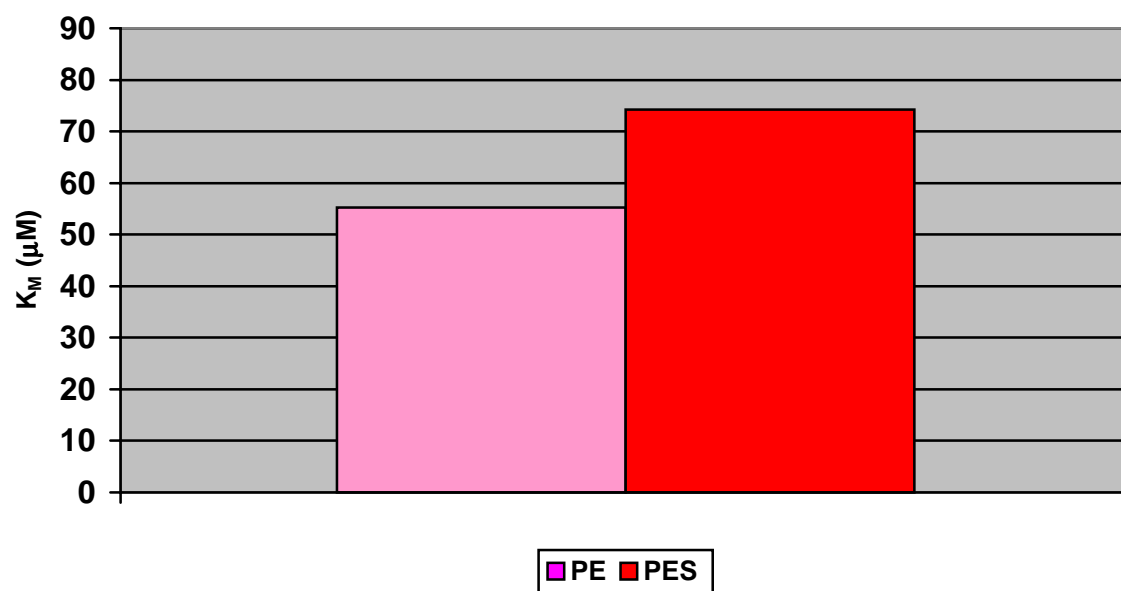


Gráfico 4 - Constante de meia saturação nos grupos PE e PES

As médias de V_{\max} e K_M foram significativamente diferentes nos dois grupos estudados, sendo maior - em ambos os casos - nas pacientes PES, conforme se pode ver descrito na Tabela 6 e ilustrado nos Gráficos 3 e 4.

TABELA 7
 V_{\max} E K_M NOS GRUPOS PE E NG

	V_{\max} ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	V_{\max} ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	K_M (μM)	K_M (μM)
PE	660,4* ($\pm 478,5$)	471,7**	55,3 ($\pm 13,7$)	56,9
NG	583,3 ($\pm 390,7$)	533,9	83,9 ($\pm 33,9$)	75,1
P	0,652	0,720	0,009	<0,001

*média \pm desvio padrão

**mediana

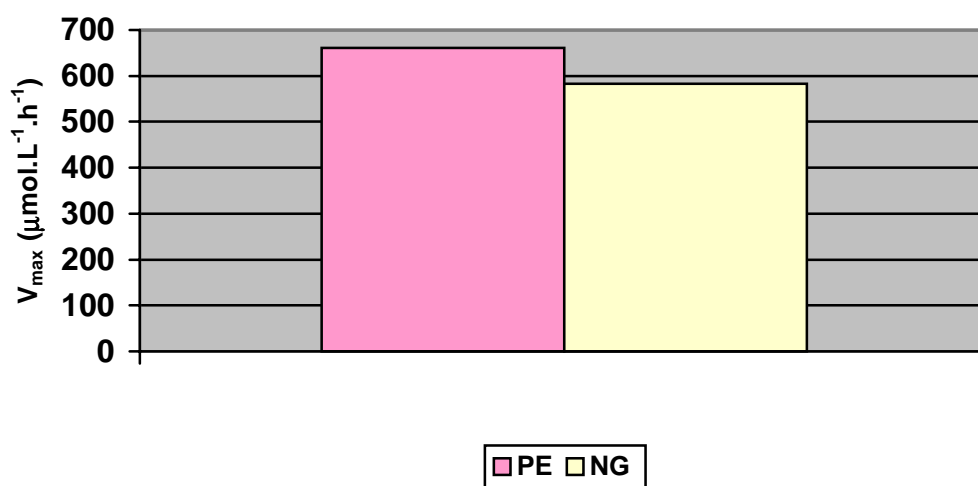


Gráfico 5 – Captação eritrocitária máxima de L-arginina nos grupos PE e NG

A Tabela 7 descreve as médias e desvios padrões de V_{\max} e K_M . As médias de V_{\max} não foram significativamente diferentes, comparados os grupos PE e NG pelos testes t de Student e não paramétrico U de Mann-Whitney.

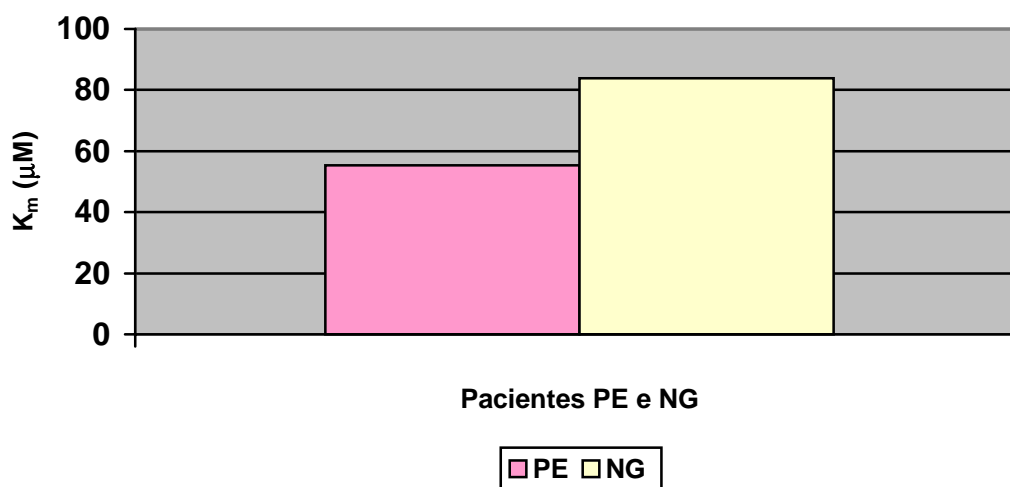


Gráfico 6 – Constante de meia saturação nos grupos PE e NG

Utilizando a mesma metodologia para comparação das médias, encontrou-se diferença significativa para média de K_M entre PE e NG, com K_M maior em NG. Os Gráficos 5 e 6 elucidam as informações presentes na Tabela 7.

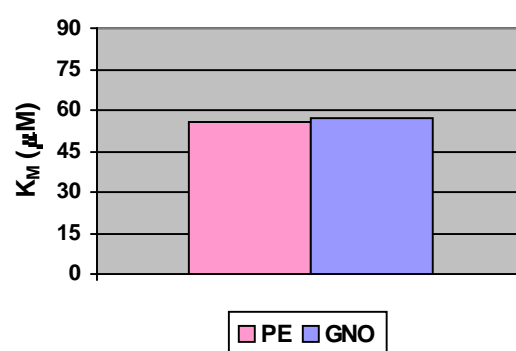
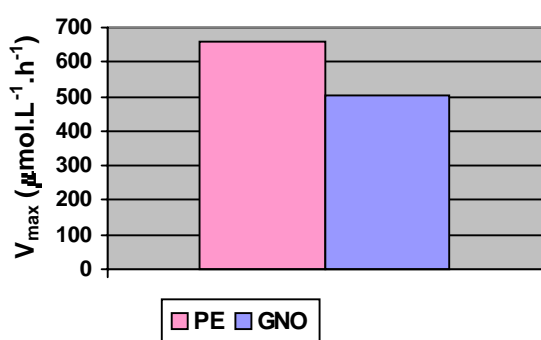
TABELA 8
V_{MAX} E K_M NO GRUPO PE E GNO

	V _{max} ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	V _{max} ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	K _M * (μM)	K _M ** (μM)
PE	660,4* ($\pm 478,5$)	471,7**	55,3 ($\pm 13,7$)	56,9
GNO	506,1 ($\pm 403,6$)	317,4	57,3 ($\pm 19,9$)	59,4
P	0,364	0,270	0,126	0,596

*média \pm desvio padrão

**mediana

Conforme pode ser visto na Tabela 8 e expresso nos Gráficos 7 e 8, as médias de V_{max} e K_M não foram significativamente diferentes entre os grupos PE e GNO.



Gráficos 7 e 8 - Captação eritrocitária máxima de L-arginina e constante de meia saturação nos grupos PE e GNO

3 Avaliação do transporte de L-arginina através da membrana celular durante e após a gestação em pacientes com DHGPE

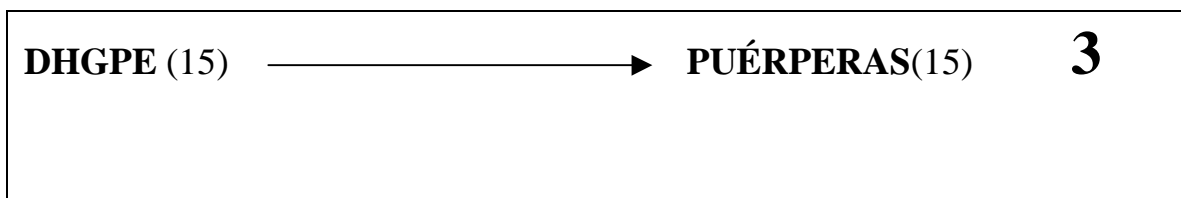


Figura 11 - Algoritmo da terceira análise

O grupo de 15 pacientes com DHGPE foi avaliado durante a gestação e no puerpério, com coletas de sangue para análise do transporte de L-arginina. Não houve perda de casos no seguimento. O quadro 1 caracteriza o grupo de pacientes submetidas a esta avaliação.

Número de gestantes	15
Faixa etária (anos)	15-40
Idade (anos)	27,1 (\pm 7,8)*
Negras (n), (%)	4 (26,66%)
Branças (n), (%)	11 (73,33%)
Gestações (n)	2,4
Primigestas (n)	5
Síndrome HELLP (n)	3
Idade gestacional da primeira coleta de sangue (semanas)	30,6 (\pm 4,9)*
Idade gestacional do parto (semanas)	32,9 (\pm 4,6)*
Pressão arterial sistólica (mm Hg)	174 (\pm 24,4)*
Pressão arterial diastólica (mm Hg)	115,7 (\pm 20,8)*
Proteinúria de 24 horas (mg)	4548,4 (\pm 3818)*

Quadro 1 - Características demográficas e clínicas na apresentação do grupo de pacientes com DHGPE submetidas à avaliação durante e após a gestação

* média (\pm desvio padrão)

TABELA 9
MÉDIAS DE V_{\max} E K_M DURANTE E APÓS A GESTAÇÃO DE
PACIENTES COM DHGPE

	V_{\max} ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	K_M^* (μM)
Durante a gestação	977,2 (\pm 504,2)	65 (\pm 13,8)
Após a gestação	1213 (\pm 602,4)	77,4 (\pm 27,7)
P	0,089	0,032

*Média e desvio padrão

Tabela 9 e Gráficos 9 e 10 ilustram a informação deste segmento do estudo, em que são representados os casos isolados, antes e depois da gestação.

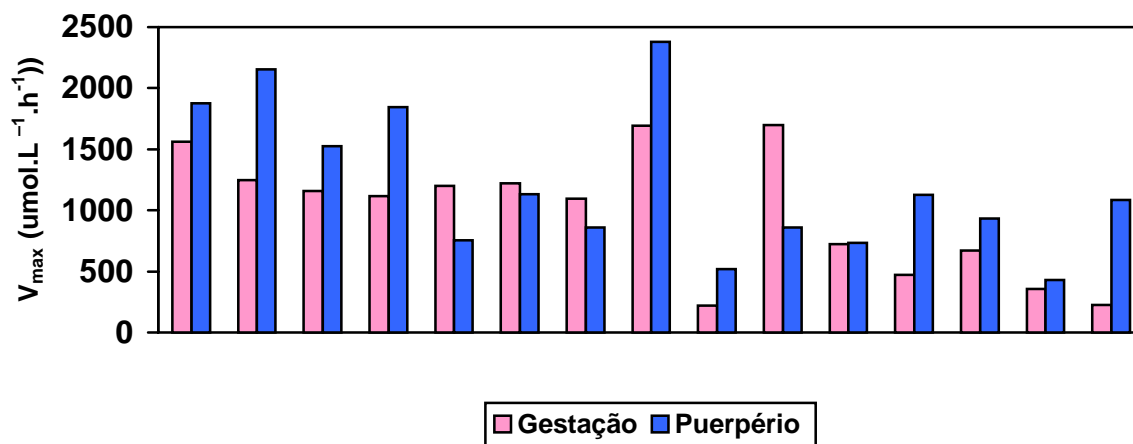


Gráfico 9 – Capacitação eritrocitária máxima de L-arginina durante e após a gestação de pacientes com DHGPE

Utilizando-se o teste t de Student para análise de amostras pareadas, verificou-se diferença significativa para K_M e não para V_{\max} durante e após a gestação. A constante de meia saturação foi maior após a gestação.

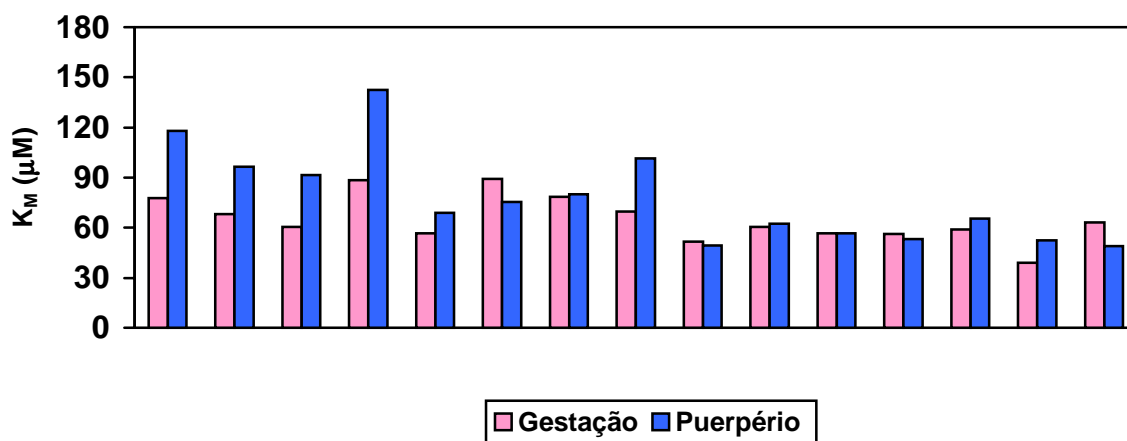


Gráfico 10 – Constante de meia saturação durante e após a gestação de pacientes com DHGPE

Realizou-se, ainda, o teste não paramétrico de Wilcoxon para grupos pareados e se manteve a significância encontrada com o teste paramétrico.

4 Avaliação do transporte de L- Arginina através da membrana celular em gestantes separadas pela gravidade do quadro clínico

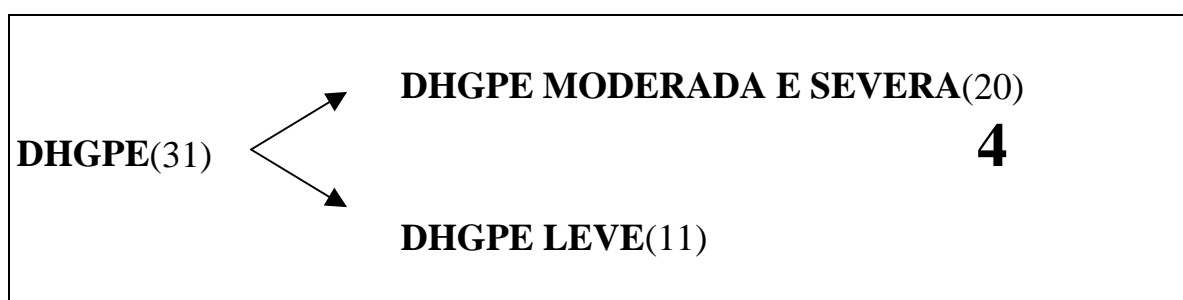


Figura 12 – Algoritmo da quarta análise

Utilizando o índice de Goecke-Schwabe, pontuamos cada caso de DHGPE e separamos 31 pacientes em dois subgrupos, após a totalização das contagens: um subgrupo de 11 pacientes com DHGPE leve e outro de 20 pacientes com DHGPE moderada e severa. A descrição de características dos segmentos é realizada na Tabela 10.

TABELA 10
CARACTERÍSTICAS DOS SUBGRUPOS, SEPARADOS POR GRAVIDADE DO QUADRO CLÍNICO

	Pacientes (n)	Faixa Etária (anos)	Média De Idade (anos)	Raça Branca (%)	Raça Negra (%)
DHGPE Leve	11	15-33	23,4(±5,5)	6(54,5%)	5(45,5%)
DHGPE moderada e severa	20	15-40	26,8(±7,3)	17(85%)*	3(15%)*

* $p < 0,05$

A média de idade não evidenciou diferença significativa. Os subgrupos diferiram quanto a raça, sendo significativamente maior o número de gestantes brancas no subgrupo DHGPE moderada e severa ($p < 0,001$).

TABELA 11
MÉDIAS DE V_{\max} E K_M EM PACIENTES COM DHGPE
MODERADO OU SEVERO E EM PACIENTES COM DHGPE
LEVE

	V_{\max} $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$	V_{\max}^{**} $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$	K_M^* μM	K_M^{**} μM
DHGPE Moderada E severa	1140,8* (±551,7)	1179*	65,7 (±13,8)	64
DHGPE Leve	776,1 (±435,5)	898,8	59,5 (±19,7)	59,7
p^{***}	0,054	0,086	0,374	0,528

*média ± desvio padrão

**mediana

Como mostra a Tabela 11, compararam-se os dois subgrupos pelo teste t de Student e, após, pelo teste U de Mann-Whitney. Não houve diferença significativa para V_{\max} e K_M . No entanto, a comparação por teste paramétrico e não paramétrico entre os V_{\max} dos dois subgrupos evidencia diferença próxima ao nível de significância determinado. Os gráficos 11 e 12 ilustram os achados.

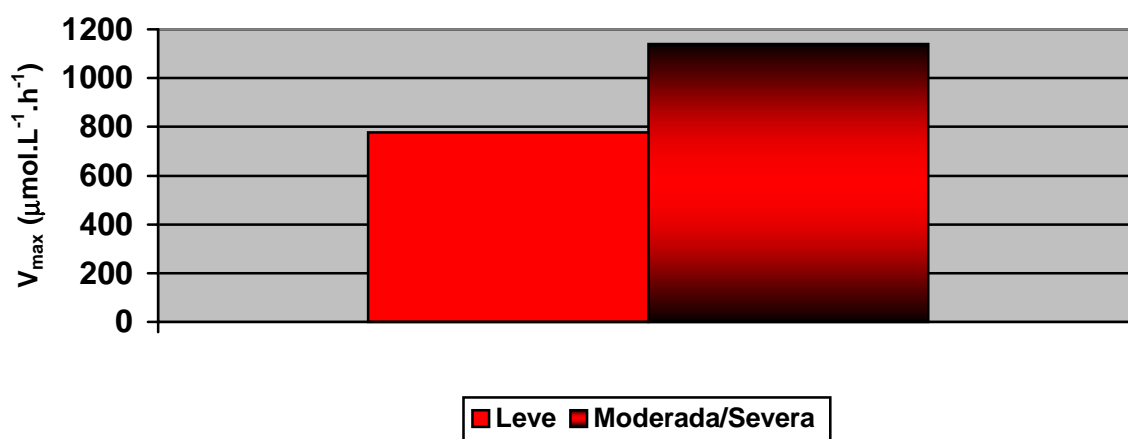


Gráfico 11 – Captação eritrocitária máxima de L-arginina em gestantes com DHGPE leve e em gestantes com DHGPE moderada e severa

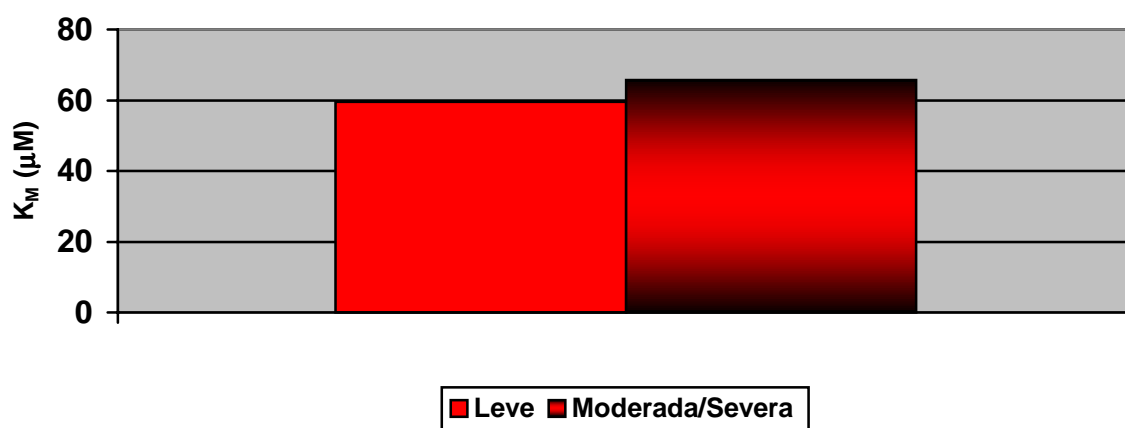


Gráfico 12 – Constante de meia saturação em gestantes com DHGPE leve e com DHGPE moderada e severa

Para as gestantes que desenvolveram a síndrome PE, examinaram-se correlações lineares entre as variáveis idade, PAS, PAD, proteinúria, V_{\max} e K_M , como mostra o Quadro II.

Utilizando o coeficiente de correlação de Pearson, com significância determinada pelo teste t , houve correlação de **forte** intensidade entre PAS e PAD, de **regular** intensidade entre idade e PAS, idade e PAD, idade e V_{\max} , idade e K_M , PAS e V_{\max} , PAS e K_M , e V_{\max} e K_M . A correlação foi de **fraca** intensidade entre PAD e V_{\max} , PAD e K_M , proteinúria e V_{\max} , e proteinúria e K_M . A correlação foi de **fraca** intensidade, tendendo à **nullidade** entre idade e proteinúria, PAS e proteinúria, e PAD e proteinúria.

	Idade	PAS	PAD	Prot	V_{\max}
PAS	0,5451 $p=0,002$				
PAD	0,5693 $p=0,001$	0,8797 $p<0,001$			
Prot	0,0538 $p=0,774$	0,0371 $p=0,843$	0,0760 $p=0,684$		
V_{\max}	0,4286 $p=0,016$	0,3353 $p=0,065$	0,2896 $p=0,114$	0,1542 0,408	
K_M	0,3381 $p=0,063$	0,3489 $p=0,540$	0,2501 $p=0,175$	0,1232 $p=0,509$	0,5953 $p<0,001$

Quadro 2 - Correlações entre idade, PAS, PAD, proteinúria, V_{\max} e K_M

Para estas informações houve significância estatística com valor de $p < 0,05$ nas correlações de Idade e PAS, Idade e PAD, Idade e V_{\max} , PAS e PAD, e V_{\max} e K_M .

VI DISCUSSÃO

O presente estudo busca melhorar o entendimento da fisiopatologia da doença hipertensiva gestacional manifesta por síndrome de pré-eclâmpsia (DHGPE), utilizando conhecimentos de fisiologia celular examinando o transporte de membrana. Alterações da permeabilidade ao sódio, o funcionamento da bomba de sódio e potássio e o contra-transporte de sódio e lítio têm sido avaliados na gestação e na DHGPE. A membrana celular, presente em todos órgãos, é candidata ao estudo de qualquer patologia multisistêmica.

Ao escolher esse assunto, pretendeu-se avaliar o transporte do aminoácido L-arginina, como uma nova abordagem, deste precursor do óxido nítrico, substância importante nos estados hipertensivos.

Usaram-se critérios de seleção para exclusão de pacientes com doença renal prévia à gestação e uma definição clara de PE e PES. Embora o “padrão ouro” para identificação seja a biópsia renal, não é aceitável expor pacientes a este risco - por menor que seja - sem benefício individual claramente estabelecido. Ao utilizar-se o exame clínico, oito semanas após o parto,

pretendeu-se excluir de PE aquelas pacientes com fundoscopia normal que permaneciam hipertensas.

A não inclusão de pacientes com doença prévia da tireóide ou hepatopatia teve como finalidade afastar outros fatores que pudessem alterar níveis pressóricos, bem como evitar dificuldade diagnóstica na “síndrome HELLP”. Pacientes em uso de hidralazina não foram consideradas pela existência de relato que informa o possível aumento na concentração de GMPc, plasmático e urinário, em gestantes com DHGPE severa, usando a droga (74)

Das 74 pacientes analisadas, excluímos dez, por critérios anteriormente estabelecidos. Duas – consideradas como normais - permaneceram com PA aumentada após a gestação, sugerindo que fossem hipertensas prévias, com a pressão arterial normalizada durante a gravidez. Cinco pacientes eram hipertensas, permaneceram hipertensas durante toda a gestação e não desenvolveram síndrome de PE. Três pacientes permaneceram com proteinúria patológica oito semanas após o parto, presumindo-se que tivessem doença renal prévia (constituindo outro grupo de risco para DHGPE, não proposto neste estudo).

A **primeira análise** contou com 64 pacientes, separadas em três grupos já definidos: NG, GNO e DHGPE. Os três grupos não apresentaram diferença significativa, quando comparados por idade, raça e idade gestacional em que foi colhido o sangue para avaliações laboratoriais.

O transporte máximo de L-arginina foi maior no grupo de gestantes com DHGPE e a afinidade pelo transportador foi maior nos grupos DHGPE e GNO comparados a NG.

Nas pacientes com DHGPE, poderia se esperar oferta deficiente de L-arginina ao meio intracelular, justificando menor produção de ON, logo, seu

envolvimento na gênese da doença hipertensiva gestacional. No entanto, a capacidade máxima de transporte esteve aumentada. À primeira impressão parece paradoxal, pois justamente este é o grupo de hipertensas no qual se presumiria deficiência de produção de ON, com disfunção no relaxamento vascular, como sugerem autores que estudaram pacientes pré-eclâmpticas (15,112) e realizaram experimentos em animais (29,71,98) A literatura mostra que deficiência crônica de L-arginina, ou bloqueio da síntese de ON - com administração de L-NAME em ratas grávidas - produziu hipertensão (29,71,98) A suplementação de L-arginina induziu redução de PA desses animais de experimentação (98)

De outro lado, a capacidade máxima de transporte de L-arginina maior no grupo DHGPE (gestantes com síndrome de PE) pode ser um fenômeno reativo ao que acontece nestas pacientes, devido à presença de hipertensão. O aumento da capacidade máxima de transporte poderia estar relacionado à necessidade de vasodilatação e, conseqüente, ao aumento da produção de ON no estado hipertensivo. Poderia ser resposta à doença, em pacientes com hipertensão, mais necessitadas de transportar L-arginina para dentro da célula e produzir mais ON, em resposta à PA não controlada. Schneider et al. (111) mostraram concentração plasmática de GMPc aumentada em pacientes com síndrome de pré-eclâmpsia antes do uso de antihipertensivos, quando comparadas a gestantes normais. Verificaram que após tratamento da HA, os níveis de GMPc diminuíram significativamente. No presente estudo as pacientes, a exemplo da avaliação de Schneider et al. (111) não tinham a PA controlada. Não se pode desprezar a possibilidade de que este seja um fenômeno de transestimulação: maior quantidade de L-arginina (ou outro substrato intracelular) levaria à troca de concentrações, mantendo a atividade dos transportadores .

Embora haja trabalhos que informem redução (15,28,29,71,95,98,112), outros tenham mostrado nenhuma alteração (19,115) ou até aumento (7,10,92,111,116) da produção de ON na DHGPE, em comparação à gestação normal, a avidéz da célula por L-arginina poderia estar aumentada, a despeito, ou não, da presença de disfunção intracelular que impeça a concretização da rota metabólica que termina em ON. Haveria alterações distintas na via L-arginina-ON: captação máxima de L-arginina e produção intracelular de ON, independentemente desarranjadas.

A menor afinidade do transportador pela L-arginina, no grupo de não gestantes, pareceu estar relacionada à ausência de gestação, já que os outros dois grupos comparados - GNO e DHGPE - foram compostos de pacientes que gestavam. Na gestação normal há vasodilatação e a circulação materna responde pouco à angiotensina e a outros agonistas vasoconstritores (12,50) Vários estudos sugerem maior produção de ON na gestação normal (29,44,57,71,92,98,112,116,124,127) e na gestação acompanhada de HA (10,92,111,116) Na gestação, maior afinidade do transportador pelo substrato L-arginina permitiria maior disposição desta fonte de ON para manutenção da vasodilatação fisiológica (GNO), ou na tentativa de recuperá-la (DHGPE)

Na gestação com DHGPE, a necessidade celular de substrato (medida pela captação eritrocitária máxima de L-arginina através da membrana do eritrócito) poderia ser maior, na tentativa de produzir mais ON para relaxar o vaso sob constrictão mediada por outros mecanismos. Isso poderia ser causado pela doença hipertensiva e não pela síndrome de PE. Para permitir a diferenciação, seria importante comparar DHGPE com um grupo de mulheres hipertensas, fora da gestação.

A **segunda análise** ocorreu no grupo DHPGE: 31 pacientes que desenvolveram síndrome de PE. Destas, foram excluídas quatro: três por

perda no acompanhamento e uma por manter-se com níveis pressóricos limítrofes para HA, com fundoscopia normal. Dividiu-se o grupo em dois subgrupos: um constituído de pacientes sem evidência de hipertensão prévia à gestação, e outro com pacientes hipertensas que se tornaram gestantes.

A divisão em dois grupos não foi de simples concretização. A separação é discutida com frequência. Fisher et al. (40) e Katz et al. (66), comparando retrospectivamente o diagnóstico clínico de PE e os achados posteriores da microscopia de luz em biópsia renal encontraram lesões típicas de PE em apenas 55 e 60 por cento, respectivamente, das supostas pré-eclâmpticas; as demais tinham nefropatia prévia. Se acrescentarmos a esta dificuldade outra maior que é separar “PE pura” de “PE superposta a HA”, teremos a medida do problema. Por isso, usamos os critérios de Smárason et al. (116), Nobunaga et al. (92) e Davidge et al. (28), acompanhando até o pós-parto pacientes que desenvolveram síndrome de PE para, só então, excluí-las ou classificá-las no primeiro ou segundo grupos.

Os subgrupos PE e PES não foram significativamente diferentes para raça, semana de gestação da coleta e do parto, peso do neonato, índice de Goecke-Schwabe, ocorrência de síndrome “HELLP”, PA sistólica, PA diastólica, edema, proteinúria de 24 horas e ácido úrico sérico. Houve diferença significativa, quanto a média de idade e número de gestações. A idade e o número de gestações, maiores no subgrupo PES, parecem se dever ao fato de que esse o grupo de hipertensas prévias, gestantes que já tinham este diagnóstico. Como se sabe, o diagnóstico de hipertensão arterial é progressivamente mais freqüente ao avançar das faixas etárias (91) O diagnóstico de PE, por sua vez, é mais freqüente em nulíparas, o que parece corroborar os achados atuais: maior número de gestações em pacientes com PES.

Ao comparar os grupos PE e PES para V_{\max} e K_M , verificou-se diferença significativa para maior capacidade máxima de transporte de L-arginina no subgrupo PES e maior afinidade do transportador por L-arginina no subgrupo PE. Nessa análise, consideramos a possibilidade de que a diferença pudesse se dever à idade, diferente entre os dois grupos. Vimos que a correlação estabelecida pelo teste de Pearson entre idade e V_{\max} foi regular ($r = 0,4286$ e $p=0,02$), conforme tabela de correlações (69). No entanto, realizando-se teste de ajuste aproximado para o efeito da idade em V_{\max} na relação de PE e PES, a diferença permaneceu significativa. Além disso, na **primeira análise** tivemos idades não significativamente diferentes entre os grupos e um dos grupos teve diferença significativa para V_{\max} .

Assim, o transporte máximo de L-arginina foi maior no grupo com hipertensão prévia e não naquele aparentemente normal, fora da gestação, reforçando a idéia da **primeira análise**: que hipertensão arterial estabelecida e anterior à gestação poderia se associar a aumento do V_{\max} .

A menor afinidade do aminoácido pelo transportador, no grupo PES, não parece suportar a idéia da **primeira análise**, de que a gestação seria o fator de diferença entre os grupos, ao se avaliar o K_M . Aqui, temos dois grupos de gestantes com afinidades significativamente diferentes. Talvez, simplesmente, a afinidade do transportador pela L-arginina seja relacionada à capacidade máxima de transporte deste aminoácido, como sugere o teste de correlação realizado para V_{\max} e K_M ($r=0,5953$, $p<0,001$); ou os dados estejam dentro de uma faixa semelhante e normal, já que compararam-se valores absolutos e não há faixas normais estabelecidas para as variáveis do transporte de L-arginina através da membrana celular.

Ao se diferenciar de PES, o subgrupo PE também é diferente do grupo maior de onde provêm (DHGPE). Consequentemente, devemos examiná-lo

melhor, comparando-o aos grupos de gestantes normais e de não gestantes. Não houve diferença significativa para V_{\max} e K_M , quando comparamos o subgrupo PE ao grupo GNO. A diferença esteve presente para K_M , quando comparamos o subgrupo em pauta ao grupo NG, sendo significativamente maior a afinidade do transportador por L-arginina, no grupo PE.

Ausência de diferença significativa entre PE e GNO para as variáveis de transporte de membrana examinadas sugere que, embora com síndrome de PE, o subgrupo PE tem oferta de L-arginina ao meio intracelular comparável a GNO. Ausência de diferenças significativas, neste estudo, talvez possa ser atribuído que ambos os grupos (PE e GNO) têm em comum o fato de não carregar o diagnóstico de HAS prévia. Davidge et al. (28) que usaram critérios semelhantes aos deste estudo para classificar PE encontraram níveis de nitratos e nitritos não significativamente diferentes quando compararam gestação com PE e gestação normal. Nobunaga e al. (92) encontraram níveis plasmáticos de nitritos e nitratos mais baixos em hipertensas fora da gestação, em comparação a gestantes normais e pré-eclâmpticas, embora seu número de observações fosse pequeno.

Quando avaliamos as comparações dos grupos PE e NG, onde não houve diferença significativa para V_{\max} , a justificativa pode estar no fato de serem grupos de não hipertensas, valendo para esta variável a mesma comparação que fizemos entre PE e GNO.

Diferença para o K_M encontraria razão em que o grupo PE é de gestantes, comparado a GN, de não gestantes. Porém, se a gestação tem importância na variação de afinidade do transportador pelo aminoácido, por que a presença de gestação não fez diferença, quando comparamos PES e NG (K_M não diferentes)? Ambos, PE e PES, têm afinidade maior do que NG, embora só haja significância estatística na comparação de PE com GN.

Os achados reforçam a idéia de que, no futuro, deve ser incluído um grupo de hipertensas não gestantes, para análise. Assim, poderia se evidenciar alguma característica para o transporte de membrana celular de L-arginina própria de pacientes com HA.

A **terceira análise** se fez com um grupo de pacientes com DHGPE em que se pôde acompanhar e medir o transporte de membrana após a gestação. Mediu-se o transporte de L-Arginina, 48 a 72 horas após o parto, e verificou-se que não houve alteração estatisticamente significativa para V_{\max} , mas sim para K_M .

V_{\max} aproximou-se da significância, mas não alcançou os níveis estabelecidos. O K_M foi maior na avaliação pós-parto.

Em relação à capacidade máxima de transporte, não houve diferença significativa pré e pós-parto. Levando-se em conta o valor de p (0,089), a significância estatística esteve próxima do nível estabelecido, mostrando aumento na captação máxima de L-arginina pós-parto. Poderia se imaginar erro do tipo II. Como explicar? Por aumento da capacidade máxima de transporte, pela atividade compensatória do sistema, com melhora clínica pós-parto? permanencia do desarranjo no sistema de transporte, não corrigido pelo término recente da gestação? De qualquer forma, a diferença não foi significativa para os limites de p considerados, logo, não há que se buscar razões para uma possibilidade estatisticamente não sugerida.

Considerando aceitável que V_{\max} não tenha sido diferente durante e após a gestação, não há explicação com auxílio da **primeira análise**. Nela, tem-se um grupo de não gestantes (sem hipertensas) que não pode ser comparado ao grupo de puérperas – muitas delas hipertensas prévias. De novo, impõe-se avaliação do transporte de L-arginina pela membrana celular em grupo de não gestantes, hipertensas e, aqui, avaliação do transporte de L-

arginina através da membrana celular em período mais tardio do puerpério destas pacientes. Ford, Robson e Mahdyz (96), estudando a resposta de vasodilatação venosa a N^G-monometil-L-arginina (inibidor da ON sintase), verificaram efeito constritivo no puerpério imediato, e não constritivo 12 semanas depois, sugerindo diferenças nos dois períodos.

Afinidade diminuída do transportador por L-arginina em DHGPE no período pós-parto pode significar que, quanto a este aspecto, o sistema esteja voltando ao normal. A literatura mostra poucos trabalhos com medidas de metabólitos do ON, pré e pós-parto. Okutomi et al. (93) mostraram dosagens de nitritos diminuídos no pós-parto, o que poderia reforçar a idéia desse estudo que mostra afinidade diminuída do transportador ao substrato do ON fora da gestação. A **primeira análise** mostrou afinidade aumentada na gestação - na comparação de dois grupos -, portanto, é aceitável que se esperasse diminuição de afinidade com a interrupção da gravidez, já que nossa hipótese é de que a gestação possa alterar a afinidade do transportador à L-arginina.

Nessa análise, a observação foi feita num grupo que, provavelmente, tem pacientes hipertensos e não hipertensos, previamente à gestação. Como foi visto na **segunda análise**, PE foi diferente de PES; caberia diferenciar, também, DHGPE em dois grupos. Assim, se poderia observar os transportes de membrana pré e pós-parto de PE e PES, separadamente.

A **quarta análise** buscou avaliar o transporte de membrana celular em relação à gravidade do quadro clínico. O que se pôde ver é que os dois grupos não variaram quanto a idade, embora a idade média fosse maior, em números absolutos, nas doentes mais graves. Houve diferença significativa quanto a raça, sendo maior o número de brancas no grupo de pacientes com doença mais grave. Não houve diferença significativa entre os dois grupos para V_{max}

e K_M . No entanto, a significância para V_{max} , comparando os grupos pelo teste t de Student ($p=0,054$) ou pelo teste não paramétrico U de Mann-Whitney ($p=0,086$), esteve próxima do nível estabelecido previamente ($p<0,05$), sugerindo a possibilidade de um erro do tipo II.

Esta proximidade de significância pode ser devida a, no índice de Goecke-Schwabe, fator importante para pontuar mais gravemente a paciente foi o nível de PA. Como foi observado, pacientes com PES - hipertensas prévias à gestação - têm captação eritrocitária máxima maior do que pacientes com PE e, também, hipertensão mais severa. Assim, no grupo de doentes mais graves, há maior número de doentes com PES. Pode-se estar observando duas vezes o mesmo fenômeno (aumento da capacidade máxima de captação de L-arginina pelos eritrócitos de pacientes com hipertensão arterial). A análise de um grupo de hipertensas, fora da gestação, talvez auxiliasse no esclarecimento desta possibilidade.

Quanto ao K_M , outra vez tem-se aqui dois grupos de gestantes que, comparadas para afinidade do transportador de membrana por L-arginina, não mostram diferença estatisticamente significativa, dando consistência a esses achados.

As quatro análises, quando combinadas, parecem apontar para os mesmos pontos:

1 A afinidade do transportador por L-arginina aumentou nas pacientes com gestação normal e com síndrome de pré-eclâmpsia, comparadas a controles não gestantes. No grupo de gestantes previamente hipertensas e com pré-eclâmpsia superposta, a afinidade do transportador pelo aminoácido foi menor do que nas demais gestantes.

2 A capacidade máxima de captação da L-arginina não aumentou nas pacientes com gestação normal, comparadas a controles não gestantes, e sim

nas que desenvolveram síndrome de pré-eclâmpsia. Quando separadas as com síndrome de pré-eclâmpsia em dois grupos - pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia superposta a hipertensão arterial prévia – verificou-se aumento nas com pré-eclâmpsia superposta.

Esse estudo aponta três caminhos que poderiam tê-lo complementado. Avaliar o transporte de L-arginina através da membrana celular em: 1- um grupo de mulheres hipertensas, fora da gestação; 2 - no puerpério tardio, nas mulheres com DHGPE em que se avaliou o transporte durante a gestação e no puerpério recente e; 3- no puerpério recente e tardio dos subgrupos derivados de DHGPE: PE e PES.

O seguimento, nesta linha de pesquisa, acompanhando gestantes de forma longitudinal, desde o início da gravidez, talvez se possa dizer mais a respeito de como se comportam aquelas que irão desenvolver a doença. Marcadores precoces da síndrome de PE, em especial nas pacientes sem fatores predisponentes conhecidos, são metas desejáveis.

Os aspectos aqui descritos são interessantes e, por vezes, curiosos de significado não suficientemente elucidado. Pode-se estar frente a um determinante genético ou, simplesmente, a um epifenômeno da doença hipertensiva gestacional manifestada por síndrome de pré-eclâmpsia. Este trabalho abre inúmeros questionamentos para outras frentes de estudo.

VII CONCLUSÕES

Neste estudo, pôde-se concluir que:

1. A capacidade máxima de transporte de L-arginina pela membrana eritrocitária esteve aumentada em gestantes com síndrome de pré-eclâmpsia, quando comparada à de gestantes e não gestantes normais;
2. A afinidade do transportador de membrana eritrocitária por L-arginina esteve aumentada em gestantes normais e gestantes com síndrome de pré-eclâmpsia quando comparada à de não gestantes normais;
3. A capacidade máxima de transporte de L-arginina pela membrana eritrocitária esteve aumentada em gestantes com pré-eclâmpsia superposta à hipertensão arterial, quando comparada à de gestantes com pré-eclâmpsia;
4. A afinidade do transportador de membrana eritrocitária por L-arginina esteve diminuída em gestantes com pré-eclâmpsia superposta à hipertensão arterial, quando comparada à de gestantes com pré-Eclâmpsia;
5. Em gestantes com síndrome de pré-eclâmpsia, a capacidade máxima de transporte de L-arginina pela membrana eritrocitária não se modificou de

maneira significativa, quando comparada a última semana de gestação ao período pós-parto precoce;

6. Em gestantes com síndrome de pré-eclâmpsia, a afinidade do transportador de membrana eritocitária por L-arginina aumentou quando comparada a última semana de gestação ao período pós-parto precoce;

7. Não houve diferença significativa na capacidade máxima de transporte de L-arginina através da membrana eritrocitária, ou na afinidade do transportador de membrana pela L-arginina, em gestantes com síndrome de pré-eclâmpsia, classificadas por gravidade do quadro clínico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams EM, Finlayson A. Familial aspects of pre eclampsia and hypertension in pregnancy. *Lancet* 1961; 2:1375.
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. Membrane Transport of Small Molecules and the Ionic Basis of Membrane Excitability. In: *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed, Garland New York & London: Publishing, Inc.; 1994, p.508-49. [chapter 11]
3. Antonello ICF. Preditores de pré-eclâmpsia (PE): avaliação parcial de estudo prospectivo de características e costumes. Anais do XV Congresso Brasileiro de Nefrologia *J Bras Nefrol* 1990 ; (Suppl 12):126.[Resumo]
4. A PIOR Dor do Parto. *Jornal do CFM* 1993; 35:6-7
5. Arant Jr. BS. Vesicoureteric Reflux and Renal Injury. *Am J Kidney Dis* 1991; 27(5):491-511.
6. Askari A, Belman AB. Vesicoureteral reflux in black girls. *J Urol* 1982; 127: 747.
7. August P, Lindheimer MD. Pathophysiology of preeclampsia. In: Laragh JH, Brenner BM. *Hypertension: patophysiology, diagnosis and management*. 2nd ed. New York : Raven Press; 1995. p.2427-2450.

8. AUMENTAM óbitos em parto de risco. *Correio do Povo* 1994 maio 29; p.11.
9. Avila-Chavez E, Torres-Y-Torres N, Tovar-Palacio AR. New concept in anionic and cationic aminoacid transport. *Rev Invest Clin* 1997; 49(5):411-24.
10. Baker PN, Davidge ST, Roberts JM. Plasma from women with preeclampsia increases endothelial cell nitric oxid production. *Hypertension* 1995; 26(2): 244-8.
11. Barron WB , Lindheimer MD. Management of Hypertension During Pregnancy. In: *Hypertension: patophysiology, diagnosis and management*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p.2427-2450. [chapter 143]
12. Barron WM. Hipertensão. In: Barron WM, Lindheimer MD. *Complicações médicas na gravidez*. Porto Alegre: Artes Médicas; 1993. [capítulo 1]
13. Baylis C, Beinder E, Suto T, August P. Recent insights into the roles of nitric oxide and renin-angiotensin in the pathophysiology of preeclamptic pregnancy. *Semin Nephrol* 1998; 18(2):208-230.
14. Beaufils M. Pregnancy. In: Davidson AM et al. *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*. 2nd ed. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press ;1998. p.1704 [vol.2]
15. Begum S, Yamasaki M, Mochosuki M. The role of nitric oxide metabolites during the pregnancy. *Kobe J Med Sci* 1996; 42(2):131-41.
16. Benigni A, gregorini G, Frusca T, Chiabrando C, Ballerini S, Valcamonico, A et al. Effect of low aspirin on fetal and maternal generation of thromboxane by platelets in women at risk for prenancu-induced hypertension. *New Engl J Med* 1989; 321(6):357-62.
17. Bernheim J. Hypertension in pregnancy. *Nephron* 1997; 76:354-263.
18. Blank SG, Helseth G, Pickering TG, West JE, August P. How should diastolic blood pressure be defined during pregnancy? *Hypertension* 1994; 24(2):234-240.
19. Boccardo P, Soregaroli M, Aiello S, Noris M, Donadelli R, Lojacono A et al. Systemic and fetal maternal nitric oxide synthesis en normal pregnancy and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103(9):879-86.

20. Brown AB, Whitworth JA. Pregnancy. In: Bennett W, McCarron DA. *Pharmacology and management of hypertension*. New York: Churchill Livingstone; 1994.
21. Chen PY, Saunders PW. Role of nitric oxide synthesis in salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *Hypertension* 1993; 22:812-8.
22. Chesley LC. Diagnosis of pre-eclampsia. *Obstet Gynecol* 1985; 65:423-5.
23. Chesley LC. The familial factor in toxemia of pregnancy. *J Obst Gynecol* 1968; 32:303-11.
24. Christensen HN, Streichner JA, Elbinger, RL. Effects of feeding individual amino acids upon the distribution of other amino acids between cells and extracellular fluid. *J Biol Chem* 1948; 172: 515-524.
25. Clark P, Boswell F, Greer IA. The Neutrophil and Preeclampsia. *Semin Rep Endocrinol* 1998; 16(1): 57-64
26. Claret M, Garay R, Giraud F. The Effect of Membrane Cholesterol On The Sodium Pump In Red Blood Cell. *J Physiol* 1978; 274: 247-63.
27. Conrad KP, Vernier KA. Plasma level, urinary excretion and metabolic production on cGMP during gestation in rats. *Am J Physiol* 1989; 257: r847-r853.
28. Davidge ST, Stranko CP, Roberts IM. Urine but not plasma nitric oxide metabolic are decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174(3): 1008-13.
29. Deng A, Engels K, Baylis C. Impact of nitric oxide deficiency on blood pressure and glomerular hemodynamic adaptations to pregnancy in the rat. *Kidney Int* 1996; 50:1132-8.
30. Deves R, Boyd CA. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev* 1998; 78(2):487-545.
31. Deves R, Chavez P, Boyd CA. Identification of a new transport system (y⁺ L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J Physiol* 1992; 454:491-501
32. Dominiczak AF, Bohr DF. Nitric oxide and its putative role in hypertension. *Hypertension* 1995; 25(6):1202-11.

33. El-Khatib MT, Becker GJ, Kincaid Smith PS. Reflux nephropathy and primary vesicoureteric reflux in adults. *QJM* 1990; 77(284):1241-53.
34. Ellory JC. Amino acid transport systems in mammalian red cells. In: Yudilevich DL, Boyd CAR. *Amino acid transport in animal cells*. Oxford: Manchester University Press; 1987. p.87-105
35. Ellory JC, Fervenza FC, Harvey CM, Hendry, BM. Heterogeneous aminoacid exchange in human erythrocyte membrane. *J Physiol* 1988; 407:11.
36. Ellory JC, Young J. Red cell membranes: a methodological approach. London: Engl. Academic Press ; 1982.
37. Equipe de informação em saúde. *Revista Prá-Saber* 1996; 1(3): 44-5.
38. Fervenza FC. Method. In: Fervenza FC. Membran transport abnormalities in patients with renal failure. Oxford University, D.Phil. thesis 1990; p 37-60.[chapter 2]
39. Fervenza FC, Hendry BM, Ellory JC. Effects of dialysis and transplantation on red cell Na pump function in renal failure. *Nephron* 1989; 53:121-8.
40. Fisher KA, Luger A, Spargo BH, Lindheimer MD. Hypertension in pregnancy: clinical-pathological correlations and remote prognosis. *Medicine* 1981; 60:267-276
41. Fitzgerald D, Rocki W, Murray R. Thromboxane A₂ synthesis in pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 1990; 335:751-54.
42. Ford GA, Robson SC, Mahdyz A. Superficial hand vein responses to N^G monomethyl-L-arginine in post-partum and non pregnant women. *Clin Sci* 1996; 90: 493-7.
43. Forrester TE, Alleyne GAO. Leucocyte e electrolytes and sodium efflux rate constants in the hypertension of preeclampsia. *Clin Sci* 1980; 59:199s-201s.
44. Forte P, Copland M, Smith LM, Milne E, Sutherland J, Benjamin, N. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet* 1997; 349:837-42.
45. Friedman E, Neff RK. Hypertension and pre-eclampsia. In: Burrow GN, Ferris TF. *Medical complication during pregnancy*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1995.
46. Friedman EA, Neff RK. Hypertension-hypotension in pregnancy: coorelation with fetal outcome. *JAMA* 1978;239:2249-2251.

47. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980, 288:373-6.
48. Gabbai F, Garcia GE, Blantz RC, De Nicola L. Role of nitric oxide in glomerular physiology and pathophysiology. In : *Advances in nephrology*. San Diego: Mosby-Year Book Inc. 24:3-18,1995.
49. Gant NF, Chand S, Worley RJ, Whalley PJ, Crosby UD, MacDonald PC. A clinical test useful for predicting the development of acute hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1974; 120(1): 1-7.
50. Gant NF, Daley GL, Chand S, Walley PJ, MacDonald PC. A study of angiotensina II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J Clin Invest* 1973; 52:2682-9.
51. Gant NF, Pritchard J. Pregnancy-induced hypertension. *Semin Nephrol* 1984; 4(3):260-69.
52. Ginsberg JM. Use of single voided urine samples to estimate quantitative proteinuria. *New Engl J Med* 1983;309:1543-46.
53. Godinho CC, Rodrigues MP, Ferreira TB, Antonello IC, Paula LG. Pré-eclâmpsia- manejo clínico. *Acta Med* 1991; p.251-65.
54. Goldenberg CA, Schirier RW. Hypertension in Pregnancy. *Semin Nephrol* 1991; 11(5):576-93.
55. Guyton AC, Hall JE. Transporte de Íons e de Moléculas Através da Membrana Celular. In: *Tratado de Fisiologia Médica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A . 1996. Cap. 4: 41-52.
56. Harvey CM, Ellory JC. Identification of aminoacid transports in red blood cells. *Methods Enzymol* 1989; 173:122-59.
57. He H, Kimura S, Fujisawa Y, Tomohiro A, Kiyimoto K, Aki Y, Abe Y. Dietary L-Arginine supplementation normalizes regional blood flow in Dahl-Iwai salt sensitives rats. *Am J Hypertens* 1997; 10:89S-93S.
58. Helmbrecht GD, Farhat MY, Lochbaum L, Brown HE, Yadgarova KT, Eglinton GS, Ramwell PW. L-arginine reverses the adverse pregnancy changes induced by nitric oxide siynthase inhibition in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 800-5.

59. Hendry BM. Membrane transport in uraemia. In :Raine AEG. *Advanced Renal Medicine*. Oxford: Oxford University Press; 1992. p.16-23.
60. Joehanning AR, Barron WM. Indirect blood pressure measurement in pregnancy: Korotkoff phase 4 versus phase 5. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167(3):577-80.
61. Jones GD, Poston L. The role of endogenous nitric oxide synthesis in contractility of term or preterm human myometrium. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104:241-45.
62. Jungers P. Specific controversies concerning the natural history of renal disease in pregnancy. *Am J Kidney Dis* 1991; 17(2):116-22.
63. Kaminski K, Rechberger T. Concentration of digoxin like immunoreactive substance in patients with preeclampsia and its relation to severity of pregnancy-induced hypertension. *Am J Obst Gynecol* 1991; 165:733-6.
64. Kaplan NM with a chapter by Ellin Liebermann. . Primary Hypertension: Pathogenesis. In: *Clinical Hypertension*. 7th ed., Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 1998. p. 47-108.[chapter 3]
65. Kaplan NM with a chapter by Ellin Liebermann. Hypertension with Pregnancy and the Pill. In: *Clinical Hypertension*. 7th ed., Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 1998. p. 323-344.[chapter 11]
66. Katz AI, Davidson JM, Hayslett JP, Singson E, Lindheimer MD. Pregnancy in women with kidney disease. *Kidney Int* 1980; 18:192-206.
67. Kaunitz, AN, Hughes JN, Grimes DA, Smith JC, Rochat RW, Kafriksen ME. Causes of maternal mortality in United States. *Obstet Gynecol* 1985;65:605.
68. Kincaid-Smith P, Fairlay KF. Renal disease in pregnancy. Three controversial areas: mesangial IgA nephropathy, focal glomerular sclerosis and reflux nephropathy. *Am Kid Dis* 1987; 9:328-33.
69. Kirkwood BR. *Essential of Medical Statistics*. Oxford: Blackwell, 1988
70. Koifman B et al . Improvement of cardiac performance by intravenous infusion of L-Arginine in patients with moderate congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26:1251-6.

71. Liao QP, Buhimschi IA, Saade G, Chwalisz K, Garfield, RE. Regulation of vascular adaptation during pregnancy and post-partum: effects of nitric oxide inhibition and steroid hormones. *Hum Reprod* 1996; 11(12):2777-2784.
72. Lindheimer MD, Katz AJ. Hypertension in pregnancy: advances and controversies *Clin Nephrol* 1991; 36(4):166-73.
73. López-Jaramillo P. Prevention of preeclampsia with calcium supplementation and its relation with the L-arginine: nitric oxide pathway. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29(6):731-41.
74. López-Jaramillo P. Cyclic guanosine 3',5' monophosphate concentrations in pre-eclampsia: effects of hydralazine. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103 (1):33-8.
75. Losekann A. *Hipertensão arterial induzida por eritropoietina recombinante em ratos: o efeito do ácido-acetil salicílico* [Dissertação]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 1997.
76. Lowenstein JM. Increased rubidium uptake by red cell during pregnancy. *Am J Physiol* 1962; 203(6):1191-2.
77. Lucio FJ, Hendry BM, Ellory JC. The effects of cholesterol depletion on the sodium pump in human red cells. *Exp Phys* 1991; 76:437-43.
78. Lutzky M. *Monitorização ambulatorial da pressão arterial em mulheres grávidas nulíparas* [Dissertação]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 1997.
79. MacAllister R, Vallance P. Nitric Oxide in Essential and Renal Hypertension. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5(4): 1057-65.
80. MacGillivray I, Rose GA, Rowe B. Blood pressure survey in pregnancy. *Clin Sci*, 1969; 37:395-407.
81. Marion I, Spearing G. A factor in pre-eclamptic serum affecting sodium transport across a membrane. *J Obstet Gynecol* 1972; 79:40-3.
82. Mendes Ribeiro AC, Hanssen H, Kiessling K, Roberts NB, Mann GE, Ellory JC. Transport of L-arginine and the nitric oxide inhibitor N^G-monomethyl-L-arginine in human erythrocytes in chronic renal failure. *Clin Sci* 1997; 93(1):57-64.

83. Miilunpalo S, Saarinen R, Marniemi J. Red-cell sodium-potassium pump and sodium-lithium countertransport in human obesity: re-evaluation of the methods and association in a finish population. *Int J Obes* 1985; 9: 313-321.
84. Miller MJS. Nitric oxid and endothelin: paradoxes and puzzles. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176(5):1116.[Letter]
85. Moncada S, Higgs A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *New Engl J Med* 1993; 339(27): 2002-12.
86. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A. Nitric oxide: phisiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2):109-42.
87. Montenegro CA, Peixoto MA, Perim SM. AAS-Eclâmpsia. *Femina* 1990 jun; 8:413-17.
88. Morris NH, Eaton BM, Dekker G. Nitric oxide, the endothelium, pregnancy and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103:4-15.
89. Nagai Y, Arai H, Washizawa Y, Ger Y, Tanaka M, Maeda M, Kawamura S. FSGS-like lesions in preeclampsia, *Clin Nephrol* 1991; 36(3):134-40.
90. NATIONAL high blood pressure education program working group report on high blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 1689-1712.
91. National Institute of Health. The sixth report of the Joint National Comittee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC VI). *Arch Intern Med* 1997; 1413-46.
92. Nobunaga T et al. Plasma nitric oxide levels in pregnant patients with preclampsia and essential hypertension. *Gynecol Obstet Invest* 1996; 41:189-93.
93. Okutomi T, Nomoto K, Nakamura K, Goto F. Nitric oxide metabolite in pregnant women before and after delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997; 76:222-6.
94. Ollofosson P. Characteristics of a reversed circadian blood pressure rhytm in pregnant woman with hypertension. *J Hum Hypertens* 1995; 9: 565-70.
95. Orpana, A K, Avela K, Ranta V, Viinikka L, Ylikorkala O . The calcium dependent nitric oxide production of human vascular endothelial cells in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174:1056-60.

96. Page EW, Christianson R. The impact of mean arterial pressure in the middle trimester upon the outcome of pregnancy. *Am J Obst Gynecol* 1976;125(6): 740-6.
97. Pinto A, Sorrentino R, Sorrentino P, Guerritore T, Miranda L, Biondi A, Martinelli P. Endothelial-derived relaxing factor released by endothelial cells of human umbilical vessels and its impairment in pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164(2):507-13.
98. Podjarny E, Ben-Chetrit S, Rathaus M, Korzets Z, Green J, Katz B, Bernheim, J. Pregnancy-induced hypertension in rats with adriamycin nephropathy. Is associated with an inadequate production of nitric oxide. *Hypertension* 1997; 29:986-91.
99. Poli de Figueiredo CE. General Introduction. In: Poli de Figueiredo CE. Membrane alterations in disease states. Oxford, Oxford University, D.Phil. Thesis 1992; p.1-39.
100. Poli de Figueiredo CE et al. Hipertensão na gravidez: análise da adequação do peso fetal à idade gestacional em 50 pacientes. *Anais do XIV Congresso Brasileiro de Nefrologia*. Florianópolis; 1988. p.95. [Resumo]
101. Poston L. Maternal vascular function in pregnancy. *J Hum Hyp* 1996; 10:391-4.
102. Remuzzi G, Ruggenenti P. Prevention and treatment of pregnancy-associated hypertension: what have we learned in the last 10 years? *Am J Kid Dis* 1991; 28(3):285-305.
103. Repke JT. Prevention of preeclampsia. *Clin Perinatol* 1991; 18(4): 779-92.
104. Reyes AA, Karl IE, Klahr S. Role of arginine in health and in renal disease. *Am J Physiol* 1994; 267: F331-F346.
105. Rosseli M, Imthurn B, Keller PJ, Jackson EK. Circulating nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 β -estradiol and norethisterone acetate. *Hypertension* 1995; 25(4 pt 2):848-53.
106. Ritz E, Vallance P, Nowicki M. The effect of malnutrition on cardiovascular mortality in dialysis patients: is L-arginine the answer? *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9:129-130.
107. Roberts JM. Endothelial Dysfunction in Preeclampsia. *Semin Rep Endocrinol* 1998; 16 (1) :5-16.

108. Roberts JM. Plasma nitrites as an indicator of nitric oxide production: unchanged production or reduced renal clearance in preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol* 1996; 176(4):954-55. [Letter]
109. Roberts JM, Redman CWG. Pre-eclampsia more than pregnancy -induced hypertension. *Lancet* 1993; 341:1447-54.
110. Rutherford PA, Thomas TH, Wilkinson R. Erythrocyte sodium-lithium countertransport: clinically useful, pathophysiologically instructive or just phenomenology? *Clin Sci* 1992; 82:341-52.
111. Schneider F, Lutun P, Baldauf J, Quirin L, Dreyfus M, Ritter J, Tempé JD . Plasma cyclic GMP concentrations and their relationship with changes of blood pressure levels in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996; 75:40-44.
112. Selligman S, Buyon JP, Robert MD, Clancy M, Young BK, Abramson, SB. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171(4): 944-48.
113. Sheehan HL. Renal morphology in preeclampsia. *Kidney Int* 1981; 18, 241-52.
114. Sibai, BM. Risk factors for preeclampsia in healthy nulliparous women: a prospective multicenter study. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172(2 pt 1): 642-8.
115. Silver RK, Kupferminc MJ, Russel TL, Adler L, Mullen TA, Caplan MS. Evaluation of nitric oxide as a mediator of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175(4): 1013-7.
116. Smáráson A, Allman KG, Young D, Redman CWG. Elevated levels of serum nitrate, a stable end product of nitric oxide, in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104:538-43.
117. Spinillo A, Capuzzo E, Baltaro F, Piazzì G, Iasci A. Case-control study of maternal blood group and severe pre-eclampsia. *J Hum Hypertens* 1995; 9:623-5.
118. Steibel JA. Transporte eritrocitário de L-arginina e Pré-eclâmpsia [Dissertação]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 1998.
119. Spitz B. Low dose aspirin and angiotensin II pressor response. *Am J Obst Gynecol* 1988; 159(5):1035-42.

120. Taylor RN, Groot JM, Cho YK, Lim KH. Circulating factors as markers and mediators of endothelial cell dysfunction in preeclampsia *Semin Reprod Endocrinol* 1998; 16 (1):17-32.
121. Young JD, Ellory JC. Flux measurements. In: Young JD, Ellory JC. *Red cell membranes: a methodological approach*. New York: Academic Press; 1982. p.119-33.
122. Wang J, Trudinger B. Endothelial cell dysfunction in preeclampsia. *JN* 1998; 11(2):53-6.
123. Wang Y, Walsh SW. Hormonal and related mechanisms for preeclampsia of pregnancy. *Endocrinologist* 1997; 7(4):238-244.
124. Weiner C. In vitro release of endothelium-derived relaxing factor by acetyl cholina is increased during the guinea pig pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161:1599-605.
125. Weissberg PL, Weaver J, Woods KI, West MJ, Beevers DG. Pregnancy induced hypertension: evidence for increased all membrane permeability to sodium. *Br Med J* 1983; 287:7-9.
126. Whyte MM, Stacy Z, Stevens T, Tyler R, Lindenfeld J, Kimberly L, Moore L. Estrogen, progesterone, and vascular reactivity: potential cellular mechanisms. *Endocr Rev* 1995; 16 (6):739-51.
127. Williams DJ, Vallance PJT, Neild GH, Spencer JAD, Imms FJ. Nitric oxide-mediated vasodilation in human pregnancy. *Am J Physiol* 1997; 272:748-52.
128. Winter CG, Christensen HN. Migration of aminoacid across the membran of erythrocyte. *J Biol Chem* 1964; 239:872-8.
129. World Health Organization Study Group. The hypertensive disorders of pregnancy. Geneva: *WHO*; 1987. P.17-31.
130. Worley RJ, Hentschel WM, Cormier C, Nutting S, Pead G, Zelenkov K, Smith JB. Increased Sodium-Lithium Countertransport in Erythrocytes of Pregnant Women. *New Engl J Med* 1982; 307:412-16.

131. Zemel MB, Berry S, Norman G, Kowalczyk C, Sokol RJ, et al. Altered platelet calcium metabolism as an early predictor of increased peripheral vascular resistance and preeclampsia in urban black Woman. *New Engl J Med* 1990; 323(7):434-38.

ANEXOS

1. Termo de Consentimento pós-informado

Eu _____, aceito participar do estudo “Avaliação Clínica e Transporte Eritrocitário da L-Arginina em Gestantes que hospitalizam com diagnóstico de Pré-eclâmpsia”, no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Estou ciente de que os procedimentos a serem realizados (coleta de sangue para exames) destinam-se a uma avaliação para inclusão no estudo. Trabalhos como este são realizados, em especial nas Faculdades de Medicina porque, sendo científicos pretendem esclarecer aos médicos aspectos sobre a doença, permitindo diagnóstico e tratamento mais adequado dos pacientes.

Porto Alegre, _____ de _____ de 199

Assinatura da paciente

2 Protocolo do transporte celular de L-arginina em DHG

Identificação

Grupo

Idade

Cor

Gesta

Peso

Altura

Grupo ABO e Rh

Para

Abortos

Idade gestacional da coleta

Idade Gestacional do parto

Pressão Arterial Sistólica

Pressão Arterial Diastólica

Edema

Creatinina sérica

Creatinina urinária (amostra)

Proteinúria em amostra

Proteinúria de 24 horas

Exame químico da urina pré-parto

Índice de Goecke-Schwabe

V_{\max}

K_M

Exame químico da urina pós-parto(8 semanas)

PA pós-parto

Sistólica

Diastólica

Responsável pelo preenchimento