

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

METABOLISMO DO ÓXIDO NÍTRICO E PARÂMETROS DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM GESTANTES COM PRÉ – ECLÂMPSIA

FABIANA BARP CREMA BERNARDI

CRICIÚMA – SANTA CATARINA
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

METABOLISMO DO ÓXIDO NÍTRICO E PARÂMETROS DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM GESTANTES COM PRÉ – ECLÂMPSIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol

CRICIÚMA – SANTA CATARINA

2007

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**METABOLISMO DO ÓXIDO NÍTRICO E PARÂMETROS DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM GESTANTES COM PRÉ – ECLÂMPZIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol

CRICIÚMA – SANTA CATARINA

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B523m Bernardi, Fabiana Barp Crema.
 Metabolismo do óxido nítrico e parâmetros de
 estresse oxidativo em gestantes com pré-eclâmpsia /
 Fabiana Barp Crema Bernardi; orientador: Felipe Dal
 Pizzol. -- Criciúma : Ed. do autor, 2007.
 55 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo
Sul Catarinense, Criciúma (SC), 2007.

1. Pré-eclâmpsia. 2. Hipertensão na gravidez
3. Estresse oxidativo. 4. Óxido nítrico. I. Título.

CDD. 21ª ed. 618.3261

Bibliotecária Rosângela Westrupp – CRB 364/14ª -
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

*Dedico essa dissertação aos meus filhos
Gustavo e Isabela que muito choraram
enquanto eu ia para o computador,
mas foi pensando neles que consegui
forças para chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao meu orientador o Prof. Dr. Felipe Dal-Pizzol pelo incentivo durante esses dois anos, e que foi inspirada no seu conhecimento e postura como professor que cada vez mais busco me superar e obter novos conhecimentos.

Quero agradecer ao meu esposo que me deu forças nas horas em que mais precisei. Quero agradecer as minhas colegas de mestrado, que fizeram destes 2 anos uma forte amizade

RESUMO

Pré-eclâmpsia é uma patologia multissistêmica e específica da gestação, de etiologia desconhecida, e que é considerada a maior causa de morbidade e mortalidade materno fetal. Suas manifestações clínicas são: hipertensão, edema e proteinúria após as 20 semanas de gestação. Teorias tem sido propostas para explicar a etiologia da pré-eclâmpsia, e alguns mecanismos propostos sugerem ser a disfunção endotelial generalizada o mais importante. Estudos prévios tem demonstrado a presença de estresse oxidativo e marcadores inflamatórios na pré-eclâmpsia. O óxido nítrico tem um papel importante na gestação normal. Muitos pesquisadores tem citado a possibilidade do envolvimento primário ou secundário do óxido nítrico na fisiopatologia e patogênese das gestantes com pré-eclâmpsia. Determinamos em 35 gestantes com pré-eclâmpsia e 35 gestantes normotensas níveis plasmáticos de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteínas carbonil, marcadores inflamatórios: TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10, atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e arginase, nitrito/nitrato (Nox) e endotelina. TBARS e proteínas carbonil foram maiores em pacientes com pré-eclâmpsia. TNF- α e IL-6, mas não IL-1 β e IL-10 foram maiores em pacientes com pré-eclâmpsia. Achamos significativa correlação entre IL-6 e carbonil e estes correlacionados com a pressão arterial. Sugerimos que alguns mediadores oxidativos e inflamatórios são mais relevantes no desenvolvimento da pré-eclâmpsia. Oxido nítrico plasmático foi significativamente menor em mulheres com pré-eclâmpsia, em adição níveis de endotelina foram significativamente maiores no grupo das pacientes com pré-eclâmpsia. A atividade da SOD foi diminuída e a atividade da arginase foi significativamente aumentada no grupo das pacientes com pré-eclâmpsia. Estes dados sugerem que na pré-eclâmpsia a excessiva expressão da arginase leva ao aumento do estresse oxidativo porque ela compete inibindo a ação da oxido nítrico sintase (NOS) e diminui a síntese do oxido nítrico. Isto pode promover o dano oxidativo microvascular e favorecer a perfusão anormal na placenta.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia. Estresse Oxidativo. Inflamação. Óxido Nítrico.

ABSTRACT

Preeclampsia is a pregnancy-specific multisystem disorder of unknown etiology and it is still the major cause of maternal, fetal and neonatal mortality and morbidity. Clinical manifestations are: hypertension, proteinuria and edema after 20 week. Theories have been proposed to explain the preeclampsia etiology and these proposed mechanisms suggests that generalized endothelial dysfunction are major features. Although previous investigators have demonstrated the presence of oxidative stress and inflammation mediators in preeclampsia. The Nitric oxide (NO) have critical roles in the normal pregnancy. Many researchers have alluded to NO's possible primary or secondary role in the pathophysiology and pathogenesis in women with preeclamptic . We determined in 35 preeclamptic and 35 normotensive pregnant women plasma levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS), protein carbonyl ,inflammation mediators: TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10, SOD and arginase activity, nitrite/nitrate (Nox) and endothelin. TBARS and protein carbonyls were higher in preeclamptic patients. TNF- α and IL-6, but not IL-1 β and IL-10 were higher in preeclamptic patients. We find significant correlation between plasma IL-6 and carbonyls, and these correlated to blood pressure. We suggested that some oxidative and inflammatory mediators were more relevant to preeclampsia development. Plasma NO was significantly lower in preeclamptic women than in normotensive pregnant women. In addition, plasma endothelin levels were significantly higher in the preeclamptic groups than in the control group. SOD activity was decreased and arginase activity were significantly increased in preeclamptic patients when compared to normotensive pregnant women. We suggested that in preeclampsia excessive arginase expression leads increase oxidative stress because it competitively inhibits the action of NOS and decrease NO synthesis .This may promote microvascular oxidative damage and favor abnormal placenta perfusion.

Key-words: Preeclampsia. Oxidative Stress. Inflammation. Nitric Oxid.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BH4 - Tetrahidrobiopterina

CAT - Catalase

GPX - Glutathione Peroxidase

IL - Interleucina

NO - Óxido Nítrico

NOS - Óxido Nítrico Sintase

Nox - Metabólitos do Óxido nítrico (Nitrito/nitrato)

PAD - Pressão Arterial Diastólica

PAS - Pressão Arterial Sistólica

PE - Pré-eclâmpsia

PG - Prostaglandina

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

SOD - Superóxido Dismutase

TBARS - Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

TX - Tromboxano

SUMÁRIO

PARTE I.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1 Pré-Eclâmpsia.....	11
2.2 Fisiopatologia.....	12
2.3 Estresse Oxidativo.....	13
2.4 Óxido Nítrico.....	14
2.5 Arginase.....	15
2.6 Endotelina.....	16
2.7 Marcadores Inflamatórios.....	16
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo Geral.....	18
3.2 Objetivos Específicos.....	18
PARTE II.....	20
4 ARTIGO I.....	20
5 ARTIGO II.....	31
PARTE III.....	46
6 DISCUSSÃO.....	46
7 CONCLUSÃO.....	49
8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	50
9 REFERÊNCIAS.....	51
ANEXOS.....	54

PARTE I

1 INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia é uma patologia multissistêmica de etiologia pouco conhecida, que afeta aproximadamente 5 - 10 % de todas as gestações. É uma causa significativa de morbidade e mortalidade do binômio materno fetal. Atualmente considera-se as desordens hipertensivas como a principal causa de mortalidade materna.

Como não existe cura para a pré-eclâmpsia durante a gestação, cada vez mais estuda-se a possibilidade de um *screening* bioquímico para predizer o risco de pré-eclâmpsia.

A placenta humana recebe seu suprimento sanguíneo de numerosas artérias útero-placentárias que se desenvolvem pela ação migratória intersticial e endovascular do trofoblasto nas artérias espirais do leito placentário. O endotélio desses vasos neoformados produz, na gestação normal, uma quantidade significativa de prostaciclina e óxido nítrico que tem uma potente ação vasodilatadora e inibidora da ação plaquetária. Uma disfunção nas células endoteliais pode ter um papel na fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

Estudos recentes correlacionam o estresse oxidativo como um dos principais fatores envolvidos na fisiopatologia da pré-eclâmpsia, justificando o grande número de estudos clínicos randomizados com uso de antioxidantes neste grupo de pacientes. Marcadores inflamatórios estão sendo dosados como uma perspectiva futura, assim como as dosagens enzimáticas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Pré-Eclâmpsia

A pré-eclâmpsia é uma patologia multissistêmica de etiologia pouco conhecida, que afeta aproximadamente 5% de todas as gestações, podendo chegar a 10% em algumas regiões do Brasil. É uma causa significativa de morbidade e mortalidade do binômio materno fetal (WAGNER, 2004). Atualmente considera-se as desordens hipertensivas como a principal causa de mortalidade materna. A pré-eclâmpsia é definida com o aumento dos níveis tensionais de pelo menos 30mmHg na pressão arterial sistólica (PAS), ou de no mínimo 15mmHg na pressão arterial diastólica (PAD), ou uma pressão arterial no mínimo de 140 x 90 mmHg em duas medidas consecutivas, constatada após as 20 semanas de gestação, associada a proteinúria significativa de 300 mg ou mais em coleção de urina de 24hs, podendo ou não estar associada a edema em mãos, face, parede abdominal, região lombo-sacra. Eclâmpsia, é o aparecimento de convulsões motoras generalizadas (tipo grande mal), coma ou ambas, em paciente com pré-eclâmpsia. Alguns são os fatores de risco para pré-eclâmpsia com primigestação, história familiar de pré-eclâmpsia / eclâmpsia, pré-eclâmpsia anterior e patologias que desenvolvem aumento da massa trofoblástica como gestação gemelar, hidropsia fetal e mola hidatiforme. Por ser uma patologia multissistêmica poderá ocorrer alterações nos sistemas hematológico, renal, hepático, nervoso, pulmonar, oftalmológico e útero-placentário. Essas alterações são maiores com a gravidade da doença. O tratamento com hipotensores é realizado quando a pressão arterial for $>$ ou $=$ 160 x 110mmHg, sendo que a Hidralazina endovenosa é a

droga de primeira escolha. Quando houver necessidade de manutenção a droga de escolha é a Metildopa Via oral. Para prevenção e tratamento da Eclâmpsia a droga de escolha é o Sulfato de Magnésio (GREENE, 2003). A cura da pré-eclâmpsia ocorre com o nascimento após a retirada da placenta, portanto a conduta está baseada na viabilidade fetal, sinais de comprometimento fetal ou agravamento do quadro materno.

Como não existe cura para a pré-eclâmpsia durante a gestação, cada vez mais estuda-se a possibilidade de um *screening* bioquímico para predizer o risco de pré-eclâmpsia. O uso de alguns marcadores no *screening* deveria refletir diferentes aspectos no processo da doença e poderia aumentar a especificidade e sensibilidade do *screening* e trabalhar diferentes fatores etiológicos (FARAG, 2005).

A etiologia é desconhecida. Fatores imunológicos, genéticos e falha na placentação são atualmente os mais aceitos. Uma falha na segunda onda de invasão trofoblástica, que ocorre entre a 16^o e 20^o semana de gestação leva a preservação da camada muscular das arteríolas criando um fluxo sanguíneo de alta resistência (LYALL, 2003).

2.2 Fisiopatologia

A placenta humana recebe seu suprimento sanguíneo de numerosas artérias útero-placentárias que se desenvolvem pela ação migratória intersticial e endovascular do trofoblasto nas artérias espirais do leito placentário (LYALL, 2003). O endotélio desses vasos neoformados produz, na gestação normal, uma quantidade significativa

de prostaciclina e óxido nítrico que tem uma potente ação vasodilatadora e inibidora da ação plaquetária. Uma disfunção nas células endoteliais pode ter um papel na fisiopatologia da pré-eclâmpsia (KUMAR, 2005).

O vasoespasmo, que é predominante na pré-eclâmpsia, provoca lesão vascular devido aos efeitos destrutivos aos vasos sanguíneos criados pela hipertensão, levando à disfunção endotelial. Esta é responsável pela ativação da cascata da coagulação, aumento da sensibilidade de agentes vasopressores, aumento da perda dos fluidos do compartimento intravascular (ROBERTS, 1997). No ambiente destituído de oxigênio ocorre aumento da síntese de peróxido de lipídeos e diminui a síntese de prostaciclina e óxido nítrico.

2.3 Estresse Oxidativo

Na gestação normal ocorre um aumento do estresse oxidativo devido a placenta ser um órgão muito vascularizado, portanto com maior número de mitocôndrias, ocorrendo um maior consumo de oxigênio e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Este estresse oxidativo é, portanto compensado pelo aumento das defesas antioxidantes endógenas como a glutathione peroxidase (GPX), superóxido desmutase (SOD) e catalase (CAT). Na pré-eclâmpsia, devido à falha de invasão trofoblástica, ocorre uma perfusão sanguínea inadequada levando a áreas de isquemia e reperfusão que aumentam a geração de ROS e provocam ativação de neutrófilos e leucócitos. O mais comum ROS é o superóxido (O_2^-), gerado nas células pela NADPH oxidase, xantina oxidase e enzimas da cadeia transportadora de elétrons

da mitocôndria. Neutrófilos isolados de mulheres com pré-eclâmpsia sintetizam mais superóxido que gestantes normais, e isto é mediado pela NADPH oxidase (RODRIGO et al, 2005).

2.4 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é sintetizado por um aminoácido não essencial, L-arginina pela ação do óxido nítrico sintase (NOS). Existem três isoformas da NOS: NOS1 (neuronal), NOS2 (induzida) e NOS3 (endotelial). NOS1 e NOS3 são consideradas constitutivas (cNOS). A NOS2 é principalmente produzida em macrófagos. O óxido nítrico produzido pelas células endoteliais causa relaxamento da musculatura vascular lisa por uma via dependente de GMPc. NO também tem outros efeitos benéficos no sistema vascular: inibição da endotelina e produção tromboxano (TXA2), estimula a produção de prostaciclina (PGI2), inibe a agregação plaquetária, inibe a produção de VCAM-1 e fibronectina, inibe a oxidação LDL e proliferação da musculatura lisa (LOWE, 2000).

Em tecidos humanos, cNOS na presença do cofator BH4 (tetra hidrobiopterina), recebe e armazena elétrons do NADPH para transformar o co-substrato oxigênio (O_2) e L-arginina a produzir óxido nítrico e L-citrulina. O BH4 fortemente ligado a e-NOS é necessário para produção de óxido nítrico. A deficiência de BH4 faz a NOS produzir superóxido (O_2^-) e uma adequada concentração de L-arginina é necessário para prevenir que a cNOS produza O_2^- . Normalmente o radical livre O_2^- é metabolizado pela enzima antioxidante SOD (superóxido desmutase) em H_2O_2

(peróxido de hidrogênio) que é metabolizado pela catalase. A reação do O_2^- com o NO é três vezes mais rápida que a reação do O_2^- com a SOD. Aumentando a produção de O_2^- aumenta a formação de peroxinitrito ($ONOO^-$) e diminui a disponibilidade de NO. $ONOO^-$ pode oxidar e destruir proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos. Isto pode levar a um aumento na peroxidação lipídica, inativar ou ativar enzimas/sistemas enzimáticos, e direta ou indiretamente causar morte celular (LOWE, 2000).

2.5 Arginase

Arginase é a enzima chave responsável pelo metabolismo do nitrogênio. Seu principal substrato é o aminoácido L-arginina. São conhecidas duas isoformas da arginase: Arginase-I é citosólica e localizada no fígado, Arginase-II é localizada primariamente na matriz mitocondrial e pode estar envolvida primariamente na produção de ornitina e outras aminas.

Há evidências que quando arginase ou NOS é ativada, elas competem inibindo uma a ação da outra, ambas por utilizarem o mesmo substrato a L-arginina ou por outros meios ainda não conhecidos (LOWE, 2000). O porquê a atividade da arginase está aumentada durante a gestação é desconhecido. O aumento da atividade da arginase no final da gestação, associado à diminuição da produção de NO parece estar relacionado com a interação enzimática.

2.6 Endotelina

Disfunção endotelial é uma patologia sistêmica relacionada com a microestrutura e função hormonal das células endoteliais. Os estados hipertensivos, cardiopatia isquêmica, mudanças na hemostasia (etc.) são resultado de uma função modificada do endotélio e da produção de substâncias vasoativas e suas interações com as células sanguíneas. O mecanismo básico para o desenvolvimento da disfunção endotelial é devido a modificação na síntese e liberação do óxido nítrico, um regulador chave para o sistema vaso-endotelial. A endotelina, sendo um peptídeo fisiologicamente ativo contribui para desenvolvimento do processo de função e disfunção do endotélio (GOMAZKOV, 2000).

O óxido nítrico diminui a produção endógena de endotelina, enquanto que o O_2^- aumenta sua produção. Estudos prévios em pacientes com pré-eclâmpsia mostrou níveis aumentados de endotelina plasmática (RUST et al 1997). A endotelina contrasta aos efeitos do NO por ser um agente que causa vasoconstrição.

2.7 Marcadores Inflamatórios

O estresse oxidativo e inflamação tem sido proposta na gênese da pré-eclâmpsia. Já está claramente demonstrado que ocorre aumento do estresse oxidativo em condições inflamatórias.

Há uma complexa interação entre citocinas e óxido nítrico cujo mecanismo ainda não está completamente elucidado. Estudos prévios mostraram que ocorre um

aumento das citocinas, principalmente TNF- α , IL-6 e IL-8 em pacientes com pré-eclâmpsia devido ao aumento de ONOO⁻ e a diminuição de NO (LOWE,2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo desse estudo é determinar a relação entre, estresse oxidativo e o desenvolvimento da pré-eclâmpsia.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar a atividade da enzima arginase em soro de gestantes com pré-eclâmpsia e comparar com gestantes sem pré-eclâmpsia;
- ✓ Determinar os níveis dos metabólitos do Óxido nítrico: nitrito/nitrato (Nox) em soro de gestantes com pré-eclâmpsia e comparar com gestantes sem pré-eclâmpsia;
- ✓ Determinar os níveis de proteínas oxidadas no soro de gestantes com pré-eclâmpsia e comparar com gestantes sem pré-eclâmpsia;
- ✓ Determinar os níveis de lipídios oxidados no soro de gestantes com pré-eclâmpsia e comparar com gestantes sem pré-eclâmpsia;
- ✓ Determinar os níveis da enzima antioxidante (SOD) no soro de gestantes com pré-eclâmpsia e comparar com gestantes sem pré-eclâmpsia;
- ✓ Determinar os níveis de Endotelina-1 no soro de gestantes com pré-eclâmpsia e comparar com gestantes sem pré-eclâmpsia;

- ✓ Determinar os níveis de marcadores inflamatórios:TNF- α ,IL-1 β , IL-6 e IL-10 no soro de gestantes com pré-eclâmpsia e comparar com gestantes sem pré-eclâmpsia.

PARTE II

4 ARTIGO I

ARTIGO: Oxidative stress and inflammatory markers in normal pregnancy and preeclampsia

STATUS: SUBMETIDO

PERIÓDICO: Short Communication *BJOG*

ARTIGO: Plasma nitric oxide, endothelin-1, arginase and superoxide dismutase in preeclamptic women

STATUS: SUBMETIDO

PERIÓDICO: International Journal of Gynecology and Obstetric

**Oxidative stress and inflammatory markers in normal pregnancy and
preeclampsia**

Fabiana Bernardi, Ângeles M. Vitali, Fabricia Petronilho, Felipe Dal-Pizzol*

Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense,
SC, Brazil

* Correspondence to: Felipe Dal Pizzol. Laboratório de Fisiopatologia Experimental,
Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil. Avenida Universitária,
1105, 88006-000. phone: 55 48 4312641, fax: 55 48 431 2750, e-mail:piz@unesc.net

Running title: Oxidative stress, inflammation and preeclampsia.

ABSTRACT

Although previous investigators have demonstrated the presence of oxidative stress and inflammation in preeclampsia, none directly correlate both in preeclampsia. We determined in 35 preeclamptic and 35 normotensive pregnant women plasma levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and protein carbonyl and TNF- α IL-1 β , IL-6 and IL-10. Plasma TBARS and protein carbonyls were higher in preeclamptic patients. TNF- α and IL-6, but not IL-1 β and IL-10 were higher in preeclamptic patients. We find significant correlation between plasma IL-6 and carbonyls, and these correlated to blood pressure. We suggested that some oxidative and inflammatory mediators were more relevant to preeclampsia development.

INTRODUCTION

Preeclampsia is a pregnancy-specific multisystem disorder of unknown etiology and it is still the major cause of maternal, fetal and neonatal mortality and morbidity. Several theories have been proposed to explain the preeclampsia etiology and these proposed mechanisms suggests that generalized endothelial cell damage and dysfunction are major features and the disease may be accepted as an endothelial cell disorder (1). Endothelial dysfunction is considered to underlie preeclampsia clinical manifestations, such as hypertension, proteinuria, and edema (1). Since endothelium is an integral part of the inflammatory network, activated endothelium activates leukocytes and vice versa. Therefore, the systemic inflammatory response is combined with systemic endothelial dysfunction such that many indicators of a systemic inflammatory response that are changed in normal pregnancy, ranging from leukocytic inflammatory markers and activity, to inflammatory changes in endothelial or clotting function, are even more marked in preeclampsia (for a review see 2). In addition, oxidative stress and inflammation are related, perhaps an inseparable phenomena. Oxidative stress was previously reported in preeclampsia (for a review see 3).

Although previous investigators have demonstrated the presence of oxidative stress and inflammation in preeclampsia, none directly correlate oxidative and inflammatory markers in preeclampsia, and correlate blood pressure with these variables.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Informed consent for the investigations described herein was obtained from all women. Approval for the study was given by the ethics committee of our University. The study population consisted of 35 preeclamptic and 35 normotensive pregnant women seen for their prenatal care at the São José Hospital, Obstetrics and Gynecology Department, Criciúma, Brazil. The diagnosis of preeclampsia was established in accordance with the definitions of American College of Obstetricians and Gynecologists. Women in labor, with ruptured membranes, multiple pregnancy, medical complications including autoimmune disorders, diabetes mellitus, inflammatory conditions and cases of chronic hypertension with superimposed preeclampsia were not included in this study. Control patients were matched with those with preeclampsia for maternal age, gestational age at delivery and gestational age at blood sampling.

Fasting peripheral venous blood samples obtained during the antepartum period, at the same gestational age in both groups, were collected before any medication into heparinized vacutainer tubes and were immediately stored at -80° C until assayed.

Oxidative Stress Markers

The formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) during an acid-heating reaction was measured as an index of oxidative stress as previously described

(4). Briefly, the samples were mixed with 1 ml of trichloroacetic acid 10% and 1 ml of thiobarbituric acid 0.67% and then heated in a boiling water bath for 15 mins. Malondialdehyde equivalents were determined by the absorbance at 535nm using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as an external standard. Results were expressed as malondialdehyde equivalents per milligram of protein (Lowry assay). The oxidative damage to proteins was assessed by the determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine as previously described (5). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid and redissolved in dinitrophenylhydrazine, and the absorbance was read at 370nm.

Inflammatory Markers

TNF- α IL-1 β IL-6 and IL-10 were determined using commercial available kits (PreproTech, Rocky Hill, NJ) according manufacturer recommendation.

Statistical Analyses

Data are expressed as mean \pm standard deviation for variables with normal distribution. Differences between groups were analyzed using independent t-test or chi-square depending on the variable characteristic. Multivariate analyses were performed to control for potential confounding factors. Pearson's correlation test was used to study associations between oxidative parameters levels and other variables. Differences with *p* values below 0.05 were considered significant.

RESULTS

There were no significant differences between the groups studied in terms of maternal age, parity, and gestational age at delivery or gestational age at the time of blood sampling relative to the values obtained for the control group (data not shown). By definition women with preeclampsia had higher diastolic blood pressure. Plasma TBARS were significantly higher in preeclamptic patients when compared with control (Table 1), and this was also true to protein carbonyls (Table 1). TNF- α and IL-6 (Table 1), but not IL-1 β , and IL-10 (data not shown) were higher in preeclamptic patients than in controls (Table 1). When analyzing the correlation between oxidative and inflammatory markers we could only find significant correlation between plasma levels of IL-6 and plasma carbonyls levels ($p < 0.01$, $r = 0.692$). Interestingly, there was no significant correlation between TBARS and carbonyls and between IL-6 and TNF- α . Only plasma carbonyls ($p = 0.002$, $r = 0.61$) and IL-6 ($p < 0.01$, $r = 0.685$) are positively correlated to diastolic blood pressure and mean arterial pressure.

DISCUSSION

Pregnancy per se is a state of oxidative stress arising from the increase metabolic activity in placental mitochondria and reduced scavenging power of antioxidants (3). Human placenta contains a functional NAD(P)H oxidase that is highly active, which could be an important source of superoxide during pregnancy and preeclampsia (3). These could generate oxidative damage that could be transported to distant sites in the body, resulting in damage at distant sites. Consistent with previous reports in patients with preeclampsia we found a significant increase in plasma levels of oxidative markers. We also noted a significant correlation between plasma carbonyls levels, but not plasma TBARS levels, and blood pressure.

Free radical generation may induce the activation of maternal neutrophils. Release of lipid peroxides into the maternal circulation and cytokine synthesis from activated neutrophils could contribute to maternal endothelial cell activation, to subsequent leukocyte adhesion, and hence to further neutrophil activation. A preeclampsia rat model, consisting of a single administration of a very low dose of endotoxin to pregnant rats, causes hypertension and proteinuria that persist until the end of pregnancy (3). High dose endotoxin causes shock in this model, and non-pregnant animals are unaffected by a similar dose (3). Infusion of TNF- α also causes hypertension in pregnant, but not in non-pregnant, rats (3). These findings are consistent to a role for proinflammatory cytokines in the genesis of preeclampsia. Thus we investigate plasma inflammatory markers and its correlation to oxidative damage markers. Some few studies demonstrated an increase in proinflammatory cytokines when comparing normal gestation and preclampsia (3), and we here demonstrated an

increase in IL-6 and TNF- α , but not IL-1 β levels in preeclamptic patients. We could not find significant differences between preeclamptic patients and normal gestation in the plasma levels of the prototype anti-inflammatory cytokine IL-10.

The relation of oxidative stress and inflammation has been proposed in the genesis of preeclampsia. It was clearly demonstrated that oxidative stress could enhance inflammatory response that could generate more oxidative stress in several inflammatory conditions. Thus, one could expect that, if a direct relation between oxidative stress and inflammatory response occurs in preeclampsia, plasma levels of oxidative and inflammatory parameters must be correlated, but the direct relation between oxidative damage markers and proinflammatory cytokines was never related in preeclamptic patients. We here demonstrated that plasma protein carbonyls levels correlate to plasma IL-6 levels, but not TNF- α or TBARS levels, and both protein carbonyls and IL-6 correlates to blood pressure levels. Plasma TBARS levels did not correlate to plasma IL-6 or TNF- α levels.

These results suggested that the inflammatory response during preeclampsia was not the "typical" systemic inflammatory response since we could not detect an increase in IL-1 β and the compensatory anti-inflammatory cytokine IL-10. In addition, it could be suggested that some oxidative and inflammatory mediators were more relevant to preeclampsia development than others. Alternatively, these results could reflect a limitation of our study design that collected blood at only one time point after preeclampsia diagnosis. Roger and cols recently demonstrated that plasma 8-isoPGF(2- α), an index of oxidative stress, appeared to be a very good predictor of subsequent gestational hypertension/preeclampsia when measured at 24-32 weeks of gestation, but

not at 34-37 weeks, suggesting a time-dependent occurrence of plasma lipid peroxidation in these patients (6).

CONCLUSION

A more detailed description of the temporal evolution of oxidative stress and inflammation during preeclampsia development was needed before the affirmation that oxidative stress and inflammatory response are closely related in the genesis of preeclampsia.

REFERENCES

- 1 - Roberts JM, Roberts NT, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:1200–1204.
- 2 - Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CWG. Inflammation and pre-eclampsia. *Seminars Fetal Neonatal Med* 2006; 11: 309-316.
- 3 - Raijmakers MTM, Dechend R, Poston L. Oxidative Stress and Preeclampsia: Rationale for Antioxidant Clinical Trials. *Hypertension* 2004; 44; 374-380.
- 4 - Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186:421-431.

- 5 - Levine RL, Garland D, Oliver CN. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994; 233: 346-357.
- 6 - Rogers MS, Wang CC, Tam WH, Li CY, Chu KO, Chu CY. Oxidative stress in midpregnancy as a predictor of gestational hypertension and preeclampsia. *BJOG* 2006; 113: 1053-1059.

Table 1 - Oxidative and inflammatory markers in normal gestation and preeclamptic patients

	<i>Preeclampsia (n=35)</i>	<i>Normal gestation (n=35)</i>	<i>p value</i>
TBARS (nm/mg protein)	0.28 ± 0.03	0.13 ± 0.06	0.026
Carbonyls (nm/mg protein)	3.93 ± 3.36	1.55 ± 1.69	0.003
IL-6 (pg/ml)	20.3 ± 7.15	N.D.	< 0.001
TNF-α (pg/ml)	37.08 ± 6.25	N.D.	< 0.001

N.D. = Not detectable

5 ARTIGO II

Plasma nitric oxide, endothelin-1, arginase and superoxide dismutase in preeclamptic women

Fabiana Bernardi, Larissa Constantino, Roberta Machado,
Fabricia Petronilho, Felipe Dal-Pizzol

Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul
Catarinense, SC, Brazil

* Correspondence to: Felipe Dal Pizzol. Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil. Avenida Universitária, 1105, 88006-000. phone: 55 48 4312641, fax: 55 48 431 2750, e-mail:piz@unesc.net

Running title : nitric oxide, endothelin, arginase, superoxide dismutase,oxidative
stress,preeclampsia.

ABSTRACT

There is previous evidence that the Nitric oxide (NO) have critical roles in the normal pregnancy. Many researchers have alluded to NO's possible primary or secondary role in the pathophysiology and pathogenesis in women with preeclampsia. We determined in 35 preeclamptic and 35 normotensive pregnant women plasma levels the SOD and arginase activity, nitrite/nitrate (Nox) and endothelin concentrations in normal and preeclamptic women. Plasma NO was significantly lower in preeclamptic women than in normotensive pregnant women. In addition, plasma endothelin levels were significantly higher in the preeclamptic groups than in the control group. SOD activity was decreased and arginase activity were significantly increased in preeclamptic patients when compared to normotensive pregnant women. We suggested that in preeclampsia excessive arginase expression leads increase oxidative stress because it competitively inhibits the action of NOS and decrease NO synthesis. This may promote microvascular oxidative damage and favor abnormal placenta perfusion.

INTRODUCTION

Preeclampsia is a pregnancy-specific multisystem disorder of unknown etiology, and is defined by the new onset of proteinuria, hypertension, and edema after 20 weeks of gestation (1). It is suggested that the placenta takes a major role in preeclampsia development, which for several proposed reasons releases factors into the maternal circulation that leads to maternal endothelial dysfunction (2). Endothelial dysfunction is considered to underlie preeclampsia clinical manifestations, such as maternal hypertension, proteinuria, and edema (3).

During a normal pregnancy there is a physiological vascular adaptation that includes increased blood volume, increased vascular output, and decreased vascular resistance. These changes are accompanied by an increase in endogenous nitric oxide. Nitric oxide (NO) is a low molecular weight mediator, which induces vasodilatation, inhibits platelets aggregation, and prevents the adhesion of platelets to endothelial cell (4). NO is synthesized from the nonessential amino acid L-arginine by the activity of NOS. The endothelial isoform of NOS (eNOS) is actually detectable in healthy placenta and is localized to the endothelium of the umbilical cord, chorionic plate, and stem villous vessels (5), but the results linking NO levels and preeclampsia was not consistent (4).

The steady-state level of NO depends on several factors, including arginine concentration, NOS activity, and superoxide concentration (4). Arginase is a key enzyme responsible for nitrogen metabolism. Its main substrate is the amino acid L-arginine, thus an increase activity of arginase could decrease its availability to the production of NO (6). In addition, an adequate concentration of L-arginine is also necessary to prevent

NOS production of superoxide, and was demonstrated that under the right circumstances, NOS production of superoxide can be significant (7). Normally superoxide is metabolized by the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD), but superoxide can also react with NO to produce peroxynitrite. The reaction of superoxide with NO proceeds three times faster than SOD, thus increasing the amount of superoxide increases peroxynitrite and decreases the available NO (8). Besides this postulated decrease in NO, a potent vasoconstrictor, endothelin, has been shown to be increased in plasma of preeclamptic patients and this is consistent with the decrease in available NO and increase in superoxide production (9). Thus a complex network occurs between NO, endothelin, SOD and arginase that could contribute to the development and progression of preeclampsia, but none published study determined and correlates all these variables in a same sample of preeclampsia patients.

Thus, the present study was designed to measure plasma SOD and arginase activity, nitrite/nitrate (Nox) and endothelin concentrations in normal and preeclamptic women.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Informed consent for the investigations described herein was obtained from all women. Approval for the study was given by the ethics committee of our University. The study population consisted of 35 preeclamptic and 35 normotensive pregnant women

seen for their prenatal care at the São José Hospital, Obstetrics and Gynecology Department, Criciúma, Brazil. The diagnosis of preeclampsia was established in accordance with the definitions of American College of Obstetricians and Gynecologists. Women in labor, with ruptured membranes, multiple pregnancy, medical complications including autoimmune disorders, diabetes mellitus, inflammatory conditions and cases of chronic hypertension with superimposed preeclampsia were not included in this study. Control patients were matched with those with preeclampsia for maternal age, gestational age at delivery and gestational age at blood sampling.

Fasting peripheral venous blood samples obtained during the antepartum period, at the same gestational age in both groups, were collected before any medication and were immediately stored at -80°C until assayed. We collected the blood early in the morning between 7 and 9 AM, 24 h after prescription of low nitrite/nitrate diets (no cured meats, spinach or beets which are the most ample sources of alimentary nitrite and nitrate) for 24 h followed by overnight fast. The compliance of subjects was checked by asking them if they had followed the diet instructions. Blood pressure was also recorded just before sampling.

Methods

- SOD activity was assayed by measuring the inhibition of adrenaline auto-oxidation, as previously described (10).
- Nitrite measurement Total concentration of NO_3^- and NO_2^- was determined in thawed serum supernatant by a modified Griess reaction method. Triplicate samples of serum were incubated for a minimum of 3 h at 20°C with glucose-6-phosphate

(500 $\mu\text{mol/L}$), glucose-6-phosphate dehydrogenase (160 U/L), NADPH (1 $\mu\text{mol/L}$), and nitrate reductase (20 U/L) in phosphate buffer (80 mmol/L, pH 7.5). The Griess reaction was then initiated by addition of sulfanilamide to a final concentration of 0.5% (wt/vol), orthophosphoric acid (1.25%, vol/vol), and *N*-(1 naphthyl)ethylenediamine hydrochloride (0.05%, wt/vol). All reagents were obtained from Sigma (Poole, Dorset, UK). After a further incubation at 20° C for 10 min, the absorbance of each sample mixture was measured at 540 nm and corrected for opacity by measuring the absorbance at 750 nm. The corrected absorbance was interpolated in a standard curve of absorbance plotted versus concentration in order to find the concentration of NO_2^- in the sample. As all NO_3^- had already been reduced to NO_2^- by the use of nitrate reductase, this represented the combined concentration of NO_3^- and NO_2^- in the serum. Results of the NO_2^- assay were expressed as NO_2^- concentration in nanomoles per milliliter of serum.

- Arginase activity was measured according to the already described procedure with slight modifications. Then, 50 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM MnCl_2 , was added, and the enzyme was activated by heating for 10 min at 56°C. Arginine hydrolysis was initiated by the addition of 25 ml 0.5 M L-arginine, pH 9.7, at 37°C for 45 min. The reaction was stopped with 400 ml H_2SO_4 (96%)/ H_3PO_4 (85%)/ H_2O (1/3/7, v/v/v). The urea concentration was measured at 540 nm after addition of 25 ml alfa-isonitrosopropiophenone (dissolved in 100% ethanol) followed by heating at 95°C for 30 min. The results of arginase activity are expressed as mg urea (12)

- Endothelin-1 was determined using commercial available kits (R&D Systems, Minneapolis) according manufacturer recommendation.

Statistical Analyses

Data are expressed as mean \pm standard deviation for variables with normal distribution. Differences between groups were analyzed using independent t-test or chi-square depending on the variable characteristic. Pearson's correlation test was used to study associations between oxidative parameters levels and other variables. Differences with *p* values below 0.05 were considered significant.

RESULTS

Plasma NO was significantly lower in preeclamptic women than in normotensive pregnant women (Table 1 $p < 0.01$). In addition, plasma endothelin levels were significantly higher in the preeclamptic groups than in the control group (Table 1 $p < 0.01$). SOD activity was decreased and arginase activity were significantly increased in preeclamptic patients when compared to normotensive pregnant women (Table 1 $p < 0.01$).

In normotensive pregnant group, there were significant negative correlations between plasma endothelin and NO ($p = 0.01$, $r = 0.61$), and a positive correlation between plasma NO and plasma SOD activity ($p = 0.003$, $r = 0.68$), but not between plasma NO and

plasma arginase activity ($p=0.12$). In this group, endothelin, NO and SOD, but not arginase, correlated with diastolic blood pressure. In the preeclamptic group, plasma endothelin and plasma NO, plasma NO and plasma SOD, and plasma NO and plasma arginase were significantly correlated (respectively $p=0.02$, $r=0.58$; $p=0.001$, $r=0.65$; $p=0.003$, $r=0.62$). In this group, the plasma levels of SOD and NO significantly decreased with the increments in diastolic blood pressure (respectively $p=0.01$, $r=0.61$; $p=0.002$, $r=0.72$). The plasma levels of arginase and endothelin significantly increased with the increments in diastolic blood pressure (respectively; $p=0.02$, $r=0.54$; $p=0.004$, $r=0.64$).

DISCUSSION

NO is synthesized from the nonessential amino acid L-arginine by action of NOS. The NO produced in endothelial cells causes vascular smooth muscle relaxation via a cyclic GMP dependent pathway. NO also has other beneficial effects in the vascular system such as inhibiting endothelin and thromboxane (TXA₂) production, stimulating prostacyclin (PGI₂) production, and inhibiting platelet aggregation. Several evidences support a role to NO in the pathogenesis of preeclampsia. The easiest way to stimulate a preeclampsia-like syndrome in rats and mice is to block production of NO by administering a NOS-inhibiting agent (13). This produces virtually all the symptoms of preeclampsia in the animal model, suggesting a direct relationship between NO production and the vascular changes in a normal pregnancy. This would imply a

possible decrease in NO production and NOS activity in the etiology of preeclampsia, but research evaluating NO production in humans has been contradictory (14-21). We here demonstrated that NO levels were reduced in preeclamptic women when compared to normal controls. This finding was reinforced by the observed increase endothelin plasma levels, and suggested the presence of endothelial dysfunction in preeclamptic patients. Differently from the inconsistent findings regarding NO levels in preeclampsia the role of increased endothelin in preeclampsia is well established (9, 22, 23), and it counteracts the effects of NO by causing potent vasoconstriction. Since the decreased production of NO and increased production of endothelin were thought to be central in the development of preeclampsia, the supplementation with L-arginine seemed reasonable to increase NO and improve preeclampsia complications, but the supplementation with L-arginine did not improve glomerular filtration rate, blood pressure or NO plasma levels in a recently published clinical trial (24).

NO levels are maintained by its production by NOS, but several factors could control NO plasma levels, including superoxide production and NOS substrate concentrations. Thus, since superoxide levels are controlled by its dismutation to hydrogen peroxide induced by SOD we demonstrated here that SOD activity was decreased in preeclamptic patients and this was correlated to NO and endothelin levels. In preeclampsia there is a decrease in antioxidants, antioxidant enzymes, and enzyme activities compared to uncomplicated pregnancies (25-27). This is consistent to an increase concentration of superoxide that can react with NO forming peroxynitrite (28). Virtually all aspects of the pathophysiology of preeclampsia can be directly or indirectly correlated with the effects of a combination of a relative NO deficiency and a peroxynitrite excess (28). In addition we demonstrated an increase in arginase activity in

preeclamptic patients. Arginase is an intracellular enzyme that appears in plasma only after cell damage or death. Both arginase and NOS use arginine as common substrate and arginase inhibits NO synthesis by reducing arginine bioavailability. Consistently with this, arginase has been demonstrated to be central in the development of pulmonary hypertension associated to sickle cell disease (29). Interestingly, plasma arginase levels did not correlate with NO and blood pressure levels in the normal gestation, but did correlate with NO and blood pressure levels in the preeclamptic patients. All other analyzed markers correlated both in the normal gestation and preeclamptic patients, suggesting that arginase activity could be differential parameter in the control of blood pressure during preeclampsia. Hladunewich and cols demonstrated that the supplementation with L-arginine could not increase plasma NO levels, and this is consistent with increase plasma arginase activity. It has been shown in preeclampsia that the umbilical blood and villous tissue contain less L-arginine, due to increased expression of the enzyme arginase II, which degrades arginine (5); as a consequence, uncoupling of eNOS occurs. This might explain, at least in part, the increased peroxynitrite formation in the placenta and vasculature in preeclampsia (30).

In conclusion, our findings suggest that normal placenta with enough tissue L-arginine sustains adequate generation of NO by e-NOS. By contrast, in preeclampsia, when the placental L-arginine concentration is low because of excessive arginase expression, activation of e-NOS leads to excessively high generation of superoxide anion, which reduces NO half-life by forming peroxynitrite. This may promote microvascular oxidative damage and favor abnormal placenta perfusion.

REFERENCES

- 1 - Wagner LK. Diagnosis and management of preeclampsia. *Am Fam Physican* 2004; 70:2317-2324.
- 2 - Kim YJ. Reduced L-arginine Level and Decrease Placental eNOS Activity in Preeclampsia. *Placenta*.2006;27:438-444.
- 3 - Wang Y, Lewis DF, Alexander JS, Granger DN. Endothelial barrier function in preeclampsia. *Front Biosci*. 2007;12:2412-24.
- 4 - Lowe DT. Nitric Oxide Disfuncion in the pathophysiology of preeclampsia. *Oxide: Biology and Chemistry*.2000;4:441-458.
- 5 - Noris M. L-Arginine Depletion in Preeclampsia Orients Nitric Oxide Syntase Toward Oxidant Species. *Hypertension*.2004;43:614-622.
- 6 - Ash DE. Structure and function of arginases. *J Nutr*. 2004 134(10 Suppl):2760S-2764S.
- 7 - Xia, Y., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Snyder, S. H., Zweier, J. L. (1996). Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 93(13), 6770–6774.
- 8 - Beckman, J. S., and Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol*. 271(5, Part 1), C1424–C1437.
- 9 - Baksu B, Davas I, Baksu A, Akyol A, Gulbaba G. Plasma nitric oxide, endothelin-1 and urinary nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate levels in hypertensive

- pregnant women. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* (2005) 90, 112-117.
- 10 - Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 1987;32:279-312.
 - 11 - Verdon, C. P., B. A. Burton, and R. L. Prior. 1995. Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP⁺ when the Griess reaction is used to assay for nitrite. *Anal. Biochem.* 224: 502-508 .
 - 12 - Corraliza, I. M., Campo, M. L., Soler, G., Modolell, M. (1994) Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J. Immunol.*
 - 13 - Yallampalli, C., and Garfield, R. E. (1993). Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am. J. O Gynecol.* 169(5), 1316–1320.
 - 14 - Mutlu-Turkoglu, U., Aykac-Toker, G., Ibrahimoglu, L., Ademoglu, E., and Uysal, M. (1999). Plasma nitric oxide metabolites and lipid peroxide levels in preeclamptic pregnant women before and after delivery. *Gynecol. Obstet. Invest.*48(4), 247–250.
 - 15 - Silver, R. K., Kupferminc, M. J., Russell, T. L., Adler, L., Mullen, T. A., and Caplan, M. S. (1996). Evaluation of nitric oxide as a mediator of severe preeclampsia. . *J. Obstet. Gynecol.* 175(4, Part 1), 1013-1017.
 - 16 - Egerman, R. S., Andersen, R. N., Manejwala, F. M., and Sibai, B. M. (1999). Neuropeptide Y and nitrite levels in preeclamptic and normotensive gravid women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 181(4), 921-923.
 - 17 - Nobunaga, T., Tokugawa, Y., Hashimoto, K., Kimura, T., Matsuzaki, N., Nitta, Y., Fujita, T., Kidoguchi, K. I., Azuma, C., and Saji, F. (1996). Plasma nitric oxide

- levels in pregnant patients with preeclampsia and essential hypertension. *Gynecol. Obstet. Invest.* 41(3), 189–193.
- 18 - Smarason, A. K., Allman, K. G., Young, D., and Redman, C. W. (1997). Elevated levels of serum nitrate, a stable end product of nitric oxide, in women with preeclampsia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 104(5), 538–543.
- 19 - Bartha, J. L., Comino-Delgado, R., Bedoya, F. J., Barahona, M., Lubian, D., and Garcia-Benasach, F. (1999). Maternal serum nitric oxide levels associated with biochemical and clinical parameters in hypertension in pregnancy. *Eur. J. O Gynecol. Reprod. Biol.* 82(2), 201–207.
- 20 - Norris, L. A., Higgins, J. R., Darling, M. R., Walshe, J. J., and Bonnar, J. (1999). Nitric oxide in the uteroplacental, fetoplacental, and peripheral circulation in preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* 93(6), 958–963.
- 21 - Shaamash, A. H., Elsnosy, E. D., Makhlof, A. M., Zakhari, M. M., Ibrahim, O. A., and EL-dien, H. M. (2000). Maternal and fetal serum nitric oxide (NO) concentrations in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 68(3), 207–214.
- 22 - Nishikawa S, Miyamoto A, Yamamoto H, Ohshika H, Kudo R. The relationship between serum nitrate and endothelin-1 concentrations in preeclampsia. *Lif* 2000;67: 1447– 54.
- 23 - Schiff E, Ben-Baruch G, Peleg E, Rosenthal T, Alcalay M, Devir M, et al. Immunoreactive circulating endothelin-1 in normal and hypertensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:624–8.

- 24 - Hladunewich MA, Derby GC, Lafayette RA, Blouch KL, Druzin ML, Myers BD. Effect of L-arginine therapy on the glomerular injury of preeclampsia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol.* 2006 Apr;107(4):886-95.
- 25 - Sagol, S., Ozkinay, E., and Ozsener, S. (1999). Impaired antioxidant activity in women with pre-eclampsia. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 64(2), 121–127.
- 26 - Mutlu-Turkoglu, U., Ademoglu, E., Ibrahimoglu, L., Aykac-Toker, G., and Uysal, M. (1998). Imbalance between lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia. *Gynecol. Obstet. Invest.* 46(1), 37–40.
- 27 - Shaarawy, M., Aref, A., Salem, M. E., and Sheiba, M. (1998). Radical-scavenging antioxidants in pre-eclampsia and eclampsia. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 60(2), 123–128.
- 28 - Zhang Y, Zhao S, Gu Y, Lewis DF, Steven Alexander J, Wang Y. Effects of Peroxynitrite and Superoxide Radicals on Endothelial Monolayer Permeability: Potential Role of Peroxynitrite in Preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 2005;12:586 –92.
- 29 - Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, Hazen SL, Vichinsky EP, Morris SM Jr, Gladwin MT. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA.* 2005 294:81-90.
- 30 - Roggensack AM, Zhang Y, and Davidge ST. Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertension* 33: 83–89, 1999.

Table 1 - SOD and arginase activity, nitrite/nitrate (Nox) and endothelin concentrations in normal and preeclamptic patients.

	<i>Preeclampsia (n=35)</i>	<i>Normal gestation (n=35)</i>	<i>p value</i>
Arginase ($\mu\text{m/L/h}$)	3.1 ± 1.2	0.85 ± 0.23	<0.01
Nox ($\mu\text{m/L}$)	45.87 ± 22.3	73.86 ± 35.21	<0.01
SOD (U/mg/protein)	12.34 ± 4.32	25.532 ± 10.23	< 0.01
Endothelin (pg/ml)	3.5 ± 1.3	1.2 ± 0.3	< 0.01

PARTE III

6 DISCUSSÃO

A gestação por si causa um aumento do estresse oxidativo devido a placenta ter um maior número de mitocôndrias e formar espécies reativas de oxigênio. Associado ao estresse oxidativo também é observado uma diminuição da ação dos antioxidantes endógenos e enzimas antioxidantes. Em pacientes com pré-eclâmpsia, observamos um significativo aumento nos níveis plasmáticos de marcadores do estresse oxidativo e alguns marcadores inflamatórios. Os níveis de IL-6 e TNF- α estavam aumentados nas pacientes com pré-eclâmpsia quando comparado com o grupo controle. Não houve aumento nos níveis de IL-1 β e não houve diferença significativa nos níveis de IL-10. Estes dados sugerem que a resposta inflamatória na pré-eclâmpsia não é “típica”, isto talvez possa ser considerado uma limitação do estudo por ter sido realizado apenas uma medida e não temos comparação de dados em diferentes idades gestacionais. Novos estudos deverão ser feitos neste sentido. Níveis de TBARS e proteínas carbonil foram significativamente maiores em gestantes com pré-eclâmpsia quando comparados com o grupo controle. Também demonstramos que há correlação entre os níveis plasmáticos de proteínas carbonil e IL-6 e ambos estão correlacionados com os níveis de pressão arterial, isto não ocorreu com TBARS ou TNF- α . Estes dados mostram a correlação do estresse oxidativo e marcadores inflamatórios na pré-eclâmpsia e que

quanto maior os níveis de pressão arterial maior o estresse oxidativo. Estes dados poderão ser confirmados com estudos futuros em pacientes com Eclâmpsia.

Diversas evidências suportam o papel do oxido nítrico na patogênese da pré-eclâmpsia. Nossos dados demonstram que os níveis de NO estão diminuídos em pacientes com pré-eclâmpsia quando comparado com grupo controle. O NO diminui a produção endógena de Endotelina enquanto que o superóxido aumenta sua produção. Nossos dados mostram que os níveis de endotelina estão aumentados no grupo de pacientes com pré-eclâmpsia, o que sugere a presença de disfunção endotelial nas pacientes com pré-eclâmpsia devido a endotelina ser um potente vasoconstritor.

O NO é sintetizado a partir da l-arginina pela ação da NOS. Uma adequada quantidade de l-arginina é necessária para prevenir que a NOS produza superóxido. Normalmente este radical livre é metabolizado pela enzima antioxidante SOD. Nossos dados mostram que a atividade da SOD está diminuída em pacientes com pré-eclâmpsia. Em contraste, observamos um aumento na atividade da Arginase reforçando a evidência de quando a arginase ou a NOS é ativada uma inibe a ação da outra, talvez por usarem o mesmo substrato ou por outro mecanismo ainda não conhecido. Interessante a análise de que níveis plasmáticos de arginase não se correlacionam com o NO e níveis pressóricos na gestação normal, mas se correlacionam com NO e pressão arterial em gestantes com pré-eclâmpsia. Todos os outros marcadores analisados se correlacionam, sugerindo que a atividade da arginase pode ser o parâmetro diferencial no controle da pressão arterial em gestantes com pré-eclâmpsia. Como observado, na pré-eclâmpsia ocorre uma diminuição nos níveis de antioxidantes endógenos e enzimas antioxidantes. Com isso, temos um aumento na formação de ONOO⁻. Todos estes aspectos da fisiopatologia da pré-eclâmpsia pode estar direta ou

indiretamente correlacionado com os efeitos da combinação deficiência de NO e excesso de ONOO^- .

7 CONCLUSÃO

A síntese de óxido nítrico tem um papel primário ou secundário na fisiopatologia da pré-eclâmpsia. Necessitamos de novos estudos com diferentes análises em relação a idade gestacional para podermos estabelecer a correta relação entre marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo na pré-eclâmpsia.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Estudar as alterações enzimática, em modelo animal;
- ✓ Estudar as alterações nos marcadores inflamatórios , em diferentes tempos, em modelo animal;
- ✓ Qual os efeitos do uso de antioxidantes, em modelo animal;
- ✓ A administração de l-arginina mudaria os resultados e a atividade enzimática, em modelo animal.

9 REFERÊNCIAS

ABRAHAM NG; KAPPAS A. Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. **Free Radical Biology & Medicine**. 2005;39:1-25

ALEXANDER BT; LLINAS MT; KRUCKEBERG, WC; GRANGER, JP. L-arginine attenuates hypertension in pregnant rats with red uterine perfusion pressure. **Hypertension**. 2004;43:832-6.

AYDIN, S; BENIAN, A; MADAZLI, R; ULUDAG S;UZUN H;KAYA S. Plasma malondialdehyde, superoxide dismutase, sE-selectin, fibronectin, endothelin-1 and nitric oxide levels in women with preeclampsia. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**. 2004;113:21-25.

BELO, L; CASLAKE, M; SANTOS-SILVA, A, CASTRO; EM, PEREIRA-LEITE, L; QUINTANILHA, A; REBELO, I. LDL size, total antioxidant status and oxidized LDL in normal human pregnancy; a longitudinal study. **Atherosclerosis**. 2004;177:391-399.

CORRALIZA, IM; CAMPO, ML; SOLER, G AND MODOLLEL M: Determination of arginase activity in macrophages a micromethod. **J. Immunol Methods**. 1994,174:231-235.

FARAG, K; HASSAN, I; LEDGER, WL. Prediction of preeclampsia; can it be achieved? **Obstet Gynecol Surv**. 2004;59 :464-38.

GREENE, MF. Magnesium Sulfate for Preeclampsia. **N Engl J Med**. 2003;348:275-6.

GOMAZKOV, AO. The molecular and physiological aspects of endothelial dysfunction. The role of endogenous chemical regulators. **Usp Fiziol Nauk**. 2000;31:48-62.

GUPTA, S; AGARWAL, A; SHARMA, RK. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. **Obstetric and Gynecological Survey**. 2005;60:807-816.

HUBEL, CA; MCLAUGHLIN, MK; EVANS, RW; AYDIN, S; BENIAN, A; MADAZLI, R; ULUDAG, S; UZUN, H; KAYA, S. Fasting serum triglycerides, free fatty acids, and

malondialdehyde are increase in preeclampsia, are ovarian tumor cell lines not dependent upon arginase inhibition. **Journal of Translational Medicine**. 2003; 1:5.

JEYABALAN, A; CARITIS, SN. Antioxidants and the prevention of preeclampsia- Unresolved Issues. **N Engl J Med**. 2006;354:1841-1843.

KUMAR, CA; DAS UN. Oxidant stress in preeclampsia and essential hypertension. **J Assoc Physicans India**. 2002;50:1372-5.

LYALL, F. Development of the utero-placental circulation : the role of ca monoxide and nitric oxide in trophoblast invasion and spiral artery transformation. **Microsc Res Tec**. 2003;60:402-11.

MELICHAR, B; HU, W; PATENIA, R; MELICHAROVÁ, K; GALLARDO, ST; FREEDMAN, R. rIFN- γ -mediated growth suppression of platinum-sensitive and resistant ovarian tumor cell lines not dependent upon arginase inhibition. **Journal of Translational Medicine**. 2003; 1:5.

NORIS, M; TODESCHINI, M; CASSIS, P; PASTA, F; CAPPELLINI, A; BONAZZOLA, S; MACCONI, D; MAUCCI, R; PORRATI, F; BENIGNI, A; PICCIOLO, C; REMUZZI, G. L-arginine depletion in preeclampsia orients nitric oxide synthase toward oxidant species. **Hypertension**. 2004;43:614-22.

ORHAN, H; ÖNDEROGLU, L; YÜCEL, A; SAHIN, G. Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. **Arch Gynecol Obstet**. 2003;267:189-195.

PASAOGLU, H; BULDUK, G; OGUS, E; PASAOGLU, A; ONALAN, G. Nitric oxide , lipid peroxides , and uric acid levels in preeclampsia and eclampsia. **Tohoku J Exp Med**. 2004;202:87-92.

PATERNOSTER, DM; FANTINATO, S; MANGANELLI, F; NICOLINI, U; MILANI, M; GIROLAMI, A. Recent progress in the the therapeutic management of pre-eclampsia. **Expert Opin Pharmacother**. 2004;5:2233-9.

RODRIGO, R; PARRA, M; BOSCO, C; FERNÁNDEZ, V; BARJA, P; GUAJARDO, J; MESSINA, R. Pathophysiological basis for the prophylaxis of preeclampsia through early supplementation whith antioxidant vitamins. **Pharmacology & Therapeutics**. 2005;107:177-197

ROBERTS, JM. Prevention or Early Treatment of Preeclampsia. **N Engl J Med.**1997;337:124-5.

ANEXOS

ANEXO 1 - FORMULÁRIO DE ADMISSÃO

NOME :

ENDEREÇO :

TELEFONES :

ESTADO CIVIL :

DATA DE NASCIMENTO :

IDADE :

G : P : C : Ab :

DUM :

DPP :

IG DUM :

IG US :

INTERCORRÊNCIAS EM GESTAÇÕES ANTERIORES :

INTERCORRÊNCIAS NA GESTAÇÃO ATUAL :

USO DE MEDICAÇÕES :

PA :

EDEMA :

PROTEINÚRIA :

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Está sendo realizado um estudo para verificar se existe alguma alteração no sangue das gestantes que possa estar alteradas em pacientes com pré-eclâmpsia. Sabe-se que esta doença não existe cura durante a gestação e portanto cada vez mais estuda-se medidas de prevenção, para que no futuro possamos evitar o surgimento e progressão da doença.

Para participar do estudo será necessário coletar, além dos exames normais determinados pelo seu médico, 10ml de sangue do braço. A retirada de sangue apresenta risco muito pequeno de complicações, principalmente o aparecimento de pequenos hematomas.

Mesmo que a senhora decida não participar deste estudo, não haverá nenhum prejuízo no seu atendimento no hospital.

Declaro ter lido as informações sobre o estudo acima. Concordo em participar do estudo e coletar sangue para este fim.

Estou de acordo que os resultados do estudo sejam publicados de forma anônima numa revista científica.

Criciúma, _____ de _____ de 200__.

Paciente _____

Responsável pelo projeto : Fabiana Barp Crema Bernardi

Telefones: (48)4335124 , (48)99740568

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)