

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E PSICOBIOLOGIA

**Efeito protetor materno-fetal do extrato hidro-alcoólico da casca de
uva vinífera em ratas grávidas tratadas com L-NAME.**

Marcio Fernandes Maradei

Rio de Janeiro
2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E PSICOBIOLOGIA

**Efeito protetor materno-fetal do extrato hidro-alcoólico da casca de
uva vinífera em ratas grávidas tratadas com L-NAME.**

Marcio Fernandes Maradei

Dissertação apresentada ao
Centro Biomédico da
Universidade do Estado do Rio
de Janeiro para obtenção do
grau de Mestre em Fisiologia e
Fisiopatologia Clínica e
Experimental.

Orientador: Professor Roberto Soares de Moura
Co-orientadora: Professora Ângela de Castro Rezende

Rio de Janeiro
2006

Ficha Catalográfica

Maradei, Marcio Fernandes

Efeito protetor materno-fetal do extrato hidro-alcoólico da casca de uva vinífera em ratas grávidas tratadas com L-NAME.

Marcio Fernandes Maradei – Rio de Janeiro, 2006.

xiv, 57f.

Tese (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

Orientador: Roberto Soares de Moura

1. Pré-eclâmpsia. 2. Extrato hidro-alcoólico. 3. Hipertensão.
4. Resistência insulínica. 5. Teses.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E PSICOBIOLOGIA

**Efeito protetor materno-fetal do extrato hidro-alcoólico da casca de
uva vinífera em ratas grávidas tratadas com L-NAME.**

Marcio Fernandes Maradei

Orientador: Professor Dr. Roberto Soares de Moura

Co-orientadora: Professora Dra. Ângela de Castro Rezende

Aprovado em ____ de _____ de 2006 pela banca
examinadora:

Professor: _____

Professor: _____

Professor: _____

Rio de Janeiro
2006

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por estar sempre ao meu lado.
- Aos meus pais Maria Helena e Mario e minha irmã Ana Paula, por todo amor, carinho e dedicação e por terem dado forças para nunca desistir.
- À minha esposa Adriana e filhas Eduarda e Luisa, por me darem alegria e apoio nas horas de dificuldade. E por compreenderem a minha ausência em alguns momentos desta trajetória.
- Ao Professor Roberto Soares de Moura, pelo exemplo de ser humano e profissional dedicado.
- À Professora Ângela de Castro Resende, por ceder sua experiência e me orientar na confecção e submissão do artigo científico referente a esta tese.
- À Professora Tânia Tano, pela sua indispensável ajuda na revisão desta tese.
- Ao Professor Aníbal Sanchez Moura, por ceder o espaço, a infra-estrutura e conhecimento imprescindíveis ao desenvolvimento desta tese.
- Aos amigos Maria Cristina Costa e Silva e Marcelo Augusto Vieira de Souza, pela competência e boa vontade.
- A todos, que de alguma forma, colaboraram para realização deste trabalho.

A todos o meu mais sincero obrigado!

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach - Acetilcolina

Ang-II – Angiotensina II

AS160 – Substrato de Akt 160

cGMP – 3',5'-guanosina monofosfato cíclico

CIR - Crescimento intra-uterino restrito

EDHF – Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

ET-1 – Receptor de endotelina 1

FAD - Dinucleotídeo flavina-adenina

FMN - Flavina mononucleotídeo

GLUT4 – Transportador de glucose 4

Grb2 – Growth factor receptor bound protein 2

GSE – Extrato de casca de uva

IRS – Substrato do receptor de insulina

ISO - Isoforma

L-NAME – N^G-nitro-L-arginina-metil éster

MAP – Mitogen-activated protein

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

PDK-1 – Phosphoinositide- dependent kinase 1

PH – Pleckstrin homology

PKB – Proteína kinase B

PKC – Proteína kinase C

RVS – Resistência vascular sistêmica

SH2 - Src-homology-2

SNC – Sistema nervoso central

SOS - Son of sevenless protein

TXA2 – Tromboxano A₂

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Vias de sinalização da insulina	12
Tabela 1 - Classificação das uvas na sistemática botânica	15
Figura 2 – Ganho ponderal entre o dia zero e o vigésimo dia da gravidez dos Grupos C-G, L-NAME-G, L-NAME+GSE-G e GSE-G	25
Figura 3 – Pressão arterial sistólica, média e diastólica das ratas não-tratadas (controle) e tratadas com L-NAME, GSE ou GSE + L-NAME	26
Figura 4 – Glicemia dos grupos C-G, L-NAME-G e L-NAME+GSE-G imediatamente antes da infusão de glicose, 15, 30, 45 e 60 minutos depois do início da infusão	27
Figura 5 – Insulinemia dos grupos C-G, L-NAME-G e L-NAME+GSE-G imediatamente antes da infusão de glicose e 15, 30, 45 e 60 minutos depois do início da infusão	28
Figura 6 – Razão insulinemia/glicemia dos grupos C-G, L-NAME-G e L-NAME+GSE-G imediatamente antes da infusão de glicose e 15, 30, 45 e 60 minutos depois do início da infusão	29
Figura 7 – Número de fetos vivos por ninhada dos grupos C-G, L-NAME-G, L-NAME+GSE-G e GSE-G.....	30
Figura 8 – Massa fetal dos fetos vivos dos grupos C-G, L-NAME-G, L-NAME+GSE-G e GSE-G.	31

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	vi
Lista de figuras e tabelas.....	vii
Resumo	x
Abstract	xii
1. INTRODUÇÃO	
1.1 - Pré-eclâmpsia	1
1.1.1 - Aspectos gerais	1
1.1.2 - Fatores de risco	2
1.1.3 - Aspectos fisiopatológicos	3
1.2 – Endotélio vascular	5
1.2.1 – Aspectos gerais	5
1.2.2 – Óxido nítrico	6
1.2.3 – Prostaciclina	7
1.2.4 – Fator hiperpolarizante derivado do endotélio	8
1.2.5 – Função endotelial na pré-eclâmpsia	9
1.3 - Resistência insulínica	10
1.3.1 – Funções da insulina	10
1.3.2 - Vias de sinalização da insulina	10
1.4 - Considerações sobre prevenção na pré-eclâmpsia	12
1.5 - Modelos experimentais de pré-eclâmpsia	14
1.6 - Características gerais das uvas	15
1.7 - Características gerais dos polifenóis	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 – Objetivo geral	18
2.2 – Objetivos específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 - Animais utilizados	19
3.2 – Tratamento	19
3.3 - Preparação do extrato de casca de uva (GSE)	20
3.4 - Registro de pressão arterial	20

3.5 - Clampeamento glicêmico, avaliação da glicemia, insulinemia e sensibilidade à insulina	21
3.6 - Registro da massa e número dos fetos vivos e número total de fetos	21
3.7 - Análises estatísticas	21
4. RESULTADOS	23
4.1 - Ganho ponderal durante a gestação	23
4.2 - Pressão arterial sistólica, média e diastólica ao final da gestação	23
4.3 - Glicemia, insulinemia e sensibilidade à insulina	24
4.4 - Número de fetos vivos por ninhada, massa dos fetos vivos e número total de fetos por ninhada	24
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO	36
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	37

RESUMO

A pré-eclâmpsia ocupa um lugar de destaque entre as doenças obstétricas. Embora a fisiopatologia da pré-eclâmpsia ainda não estar claramente estabelecida, disfunção endotelial e estresse oxidativo têm papel importante na sua gênese. Tais desequilíbrios levam a um quadro clínico de hipertensão arterial sistêmica, proteinúria, resistência insulínica e, em alguns casos, há presença de edema generalizado. Já que o extrato de cascas de uva vinífera (Grape Skin Extract -GSE) possui efeito vasodilatador e anti-hipertensivo endotélio-dependente e atividade antioxidante, efeitos estes comprovados previamente em nosso laboratório, resolvemos testar sua ação protetora materna e fetal em um modelo experimental de pré-eclâmpsia em ratas, pela inibição da óxido nítrico sintase (NOS) induzida pelo L-NAME. **Metodologia:** Quatro grupos (C-G, L-NAME-G, L-NAME+GSE-G, GSE-G) de ratas grávidas receberam, do dia 13 ao dia 20 da gestação, na água de beber: 1) apenas água (grupo controle – C-G); 2) aproximadamente 60 mg/kg/dia de L-NAME (L-NAME-G); 3) aproximadamente 60 mg/kg/dia de L-NAME + 200 mg/kg/dia de GSE (L-NAME+GSE-G) ou 4) aproximadamente 200 mg/kg/dia de GSE (GSE-G). Outros dois grupos (C-NG, L-NAME-NG) de ratas não grávidas receberam, durante sete dias: 5) somente água (grupo controle – C-NG) ou 6) aproximadamente 60 mg/kg/dia de L-NAME (L-NAME-NG). No vigésimo dia de gestação, foram avaliadas as pressões arteriais sistólica, média e diastólica em todos os grupos. Além disso, registramos o número de fetos vivos por ninhada, ganho ponderal materno durante a gravidez e massa dos fetos vivos nos grupos de ratas grávidas. Conjuntamente, foram analisadas a glicemia, insulinemia e razão insulina/glicose depois de um jejum de seis horas e 15, 30, 45 e 60 minutos após o início de infusão de glicose (9,92 µg/g/min) nos grupos C-G, L-NAME-G, L-NAME+GSE-G. **Resultados:** O GSE inibiu a hipertensão induzida pelo L-NAME tanto nas ratas grávidas como nas não grávidas. Também foi verificada ação protetora sobre a redução do número de fetos vivos por ninhada, causada pela inibição da NOS durante a gravidez, visto que este número no grupo tratado apenas com L-NAME ficou em $4,87 \pm 1,86$ e que, no grupo tratado com L-NAME + GSE, não houve diferença significativa em relação ao grupo controle, ficando em $9,14 \pm 1,30$. O GSE mostrou ação protetora sobre a resistência insulínica causada pelo tratamento com L-NAME durante a gestação. Isto ficou explícito quando analisamos que, durante a infusão de glicose, a razão insulina/glicose em t15 do grupo tratado apenas com L-NAME obteve valores

significativamente maiores do que os obtidos no grupo controle, fato este não observado em relação ao grupo tratado com L-NAME + GSE. O ganho ponderal materno durante a gravidez e a massa dos fetos vivos não foram significativamente diferentes entre os grupos. **Conclusão:** De acordo com os resultados obtidos, o GSE poderá ser um importante aliado na prevenção e no tratamento da pré-eclâmpsia.

ABSTRACT

Preeclampsia has an outstanding position amongst obstetrical diseases. Despite the fact that preeclampsia pathophysiology still remains unclear, endothelial dysfunction and oxidative stress play a major part on its origin. Such dysfunctions lead to a situation of systemic arterial hypertension, proteinuria, insulin resistance and, in some cases, to generalized edema. Since the GSE has antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects as well as antioxidant action – effects which were previously verified in our laboratory – we decided to test its maternal and fetal protective action in an experimental model of preeclampsia in female rats, induced by inhibition of the nitric oxide synthase (NOS) induced by L-NAME. **Methods:** Four groups (C-G, L-NAME-G, L-NAME+GSE-G, GSE-G) of pregnant rats received, between days 13 and 20 of their pregnancy, in drinking water: 1) water only (control group – C-G), 2) 60mg/kg/day of L-NAME (L-NAME-G), 3) 60mg/kg/day of L-NAME + 200mg/kg/day of GSE (L-NAME+GSE-G) or 4) 200mg/kg/day of GSE (GSE-G). Two other groups (C-NG, L-NAME-NG) of non-pregnant rats have received for 7 days: 1) water only (control group – C-NG) or 2) 60mg/kg/day of L-NAME (L-NAME-NG). On the twentieth day of pregnancy, we measured, in all groups, the systolic, mean and diastolic blood pressure. We registered the number of living fetuses per litter, as well as the maternal ponderal variation during pregnancy and body weight of the living fetuses in the pregnant rats groups. In addition, we have analysed the glycemia, insulinemia and insulin/glucose ratio after a six-hour fasting period and also 15, 30, 45 and 60 minutes after the beginning of glucose infusion (9,92ug/g/min) in the C-G, L-NAME-G and L-NAME+GSE-G groups. **Results:** GSE reduced the increase in arterial blood pressure induced by L-NAME in pregnant and non-pregnant rats. We also verified protective action over the decrease of the number of living fetuses per litter, caused by the inhibition of NOS during pregnancy, as this number in the group treated only with L-NAME was 4.87 ± 1.86 , while in the group treated with L-NAME + GSE there was no significant difference in contrast with the control group, the number found being $9,14 \pm 1,30$. The GSE has shown protective action over the insulin resistance caused by the treatment with L-NAME during pregnancy. This was made clear when we analysed, during infusion of glucose, that the insulin/glucose ratio in t15 of the group treated only with L-NAME obtained values significantly higher than those obtained in the control group. This occurrence was not noticed in regard to the group treated with L-

NAME+GSE. The maternal ponderal variation during pregnancy as well as the body weight of the living fetuses were not significantly different amongst the groups.

Conclusion:According to the found results, GSE may be an important ally in the prevention and treatment of preeclampsia.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Pré-eclâmpsia

1.1.1- Aspectos gerais

As mulheres são relativamente protegidas de doenças cardiovasculares durante a fase reprodutiva, mas pagam um tributo por isso. As intercorrências clínicas da gravidez não se expressam apenas nos índices de mortalidade fetal, elas também sacrificam inúmeras vidas maternas. Além de poder apresentar todas as doenças que acometem uma mulher não grávida, exceto a infertilidade, a mulher grávida se arrisca a uma série de afecções inerentes à condição gravídica (Pascoal, 1998).

Duas formas principais de hipertensão arterial podem complicar a gravidez: pré-eclâmpsia e hipertensão crônica, que ocorrem individualizada ou associadamente.

Hipertensão crônica se refere à hipertensão de qualquer etiologia, que está presente antes da gravidez ou da 20^a semana de gestação. Hipertensão diagnosticada em qualquer fase da gravidez, mas que persiste além de 6 semanas após o parto é também considerada hipertensão crônica. A denominação “crônica” é utilizada para fazer oposição semântica à natureza súbita e reversível da pré-eclâmpsia (Pascoal, 1998).

Pré-eclâmpsia é uma doença hipertensiva peculiar à gravidez humana, que ocorre principalmente em primíparas após a 20^a semana de gestação, mais freqüentemente próximo ao termo. Envolve virtualmente cada órgão e sistema do organismo e é a principal causa de morbidade e de mortalidade, tanto materna quanto fetal. Caracteriza-se pelo desenvolvimento gradual de hipertensão, proteinúria, edema generalizado e, às vezes, alterações da coagulação e da função hepática. A sobreveniência de convulsão define uma forma grave, chamada eclâmpsia (Pascoal, 1998). Segundo informação do Ministério da Saúde (2006) a principal causa de mortalidade materna no Brasil, em 2004, foi a pré-eclâmpsia: 16% dos óbitos obstétricos diretos. Nos Estados Unidos a pré-eclâmpsia é a segunda causa de morte materna: 15% do total. No mundo estima-se que 200.000 mulheres/ano morram de pré-eclâmpsia e suas complicações (Hayman, 2004). Segundo a Preeclampsia Foundation, a cada seis minutos, uma mulher morre de pré-

eclâmpsia e o distúrbio afeta mais de 6 milhões de mulheres por ano no mundo inteiro. Apesar de sua complexidade clínica e natureza potencialmente grave, a pré-eclâmpsia é a forma mais comum de hipertensão “curável” e é inteiramente reversível com a interrupção da gravidez (Pascoal, 1998).

A fisiopatologia vascular da pré-eclâmpsia se caracteriza por integral reversão das alterações fisiológicas próprias da gravidez normal (Mancia *et al.*, 1983; August *et al.*, 1995). Por exemplo, mulheres grávidas normalmente experimentam expressiva vasodilatação periférica, tanto que, a despeito de elevação no débito cardíaco, a pressão arterial sistêmica diminui. Na pré-eclâmpsia, ao contrário, observam-se pequenas alterações no débito cardíaco, sendo o aumento na pressão arterial fundamentalmente dependente da elevação na resistência vascular periférica (Rezende Filho, 2006). Além disso, a vasculatura de mulheres grávidas normais é refratária aos efeitos pressores da angiotensina II, enquanto aquela de mulheres pré-eclâmplicas apresenta aumentada sensibilidade a este peptídeo, mesmo antes das manifestações clínicas (August *et al.*, 1995).

Embora a causa da pré-eclâmpsia ainda esteja por ser determinada, estudos recentes sugerem que seu caráter multissistêmico pode refletir intensa disfunção da célula endotelial. O envolvimento do óxido nítrico (NO) na fisiopatologia da pré-eclâmpsia é sustentado por estudos experimentais que mostraram inibição da óxido nítrico sintase (NOS) em ratas grávidas, resultando numa condição similar à pré-eclâmpsia (Baylis *et al.*, 1992; Yallampalli *et al.*, 1993). Além disso, inibidores endógenos da NOS são detectáveis no plasma de pacientes com pré-eclâmpsia (Fickling *et al.*, 1993; Holden *et al.*, 1998; Pettersson *et al.*, 1998). Neste sentido, foi verificado menores concentrações de nitrato/nitrito na urina de pacientes com pré-eclâmpsia, em relação a pacientes com gravidez normal (Schiessl *et al.*, 2006). Assim, tem sido sugerido que a diminuição na síntese de vasodilatadores endógenos de ação local (primariamente NO) é um mecanismo crucial envolvido na patogênese e perpetuação da hipertensão na pré-eclâmpsia.

1.1.2- Fatores de risco

Alguns fatores de risco para pré-eclâmpsia merecem referência (Fayyad & Harrington, 2005). Primíparas têm 15 vezes mais oportunidades de desenvolver pré-eclâmpsia do que múltiparas. Todavia o risco de recorrência varia de 7 a 13% e é de

20% se a pré-eclâmpsia foi grave o suficiente para exigir a antecipação do parto. A história familiar aumenta o risco de 8 vezes e a hipertensão, doença renal crônica e certas condições fetais (gemelar, mola, triploidia) também elevam esse risco (Rezende Filho, 2006). Há evidências de que fatores imunológicos relacionados a antígenos do esperma paterno são importantes na gênese da pré-eclâmpsia. Embora primíparas jovens apresentem maiores riscos, múltiparas com um novo parceiro têm alta incidência de pré-eclâmpsia (Trupin *et al.*, 1996). Por outro lado, a duração da co-habitação antes da concepção se relaciona inversamente com o risco de pré-eclâmpsia, sugerindo que prolongada exposição materna a antígenos do esperma paterno confere proteção (Einarsson *et al.*, 2006; Friedman *et al.*, 1991). Pré-eclâmpsia também está associada com a idade materna, aumentando sua incidência em mulheres acima de 35 anos (Pascoal, 1998). O tabagismo na gravidez diminui a produção de NO através da redução de atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) na circulação fetal, que pode contribuir para o crescimento intra-uterino restrito (CIR) conseqüente à disfunção endotelial e à redução da capacidade vasodilatadora dos vasos (Andersen *et al.*, 2004).

Por outro lado, é consenso na literatura que o tabagismo diminui a incidência de pré-eclâmpsia, não obstante eleve o risco de doença cardiovascular prematura no futuro (Ray *et al.*, 2005).

1.1.3- Aspectos fisiopatológicos

A hipertensão da pré-eclâmpsia é caracteristicamente transitória e apresenta uma tendência à reversão do ritmo circadiano normal da pressão arterial, ou seja, intensificação dos níveis pressóricos à noite, ao invés da queda noturna habitual (Mancia *et al.*, 1983).

A placenta é pré-requisito para o desenvolvimento da pré-eclâmpsia. Há a hipótese que a placenta seja o lugar de origem de certas substâncias tóxicas que determinam as manifestações maternas da pré-eclâmpsia (Connors & Merrill, 2004).

A pré-eclâmpsia é hoje considerada doença em dois estágios (Rezende Filho *et al.*, 2005). A habilidade para liberar substâncias tóxicas na circulação materna é atribuída à placenta, no início da gravidez, durante a placentação. Na gravidez normal, as artérias espiraladas (ramos da artéria uterina) são invadidas pelo trofoblasto, o qual destrói a musculatura lisa, transformando-as em um conduto

praticamente sem resistência. Este processo se completa em torno da 20^a-22^a semana de gestação. Contrariamente ao que ocorre na gravidez normal, essa transformação é aberrante na pré-eclâmpsia, deixando a circulação útero-placentária em regime de alta resistência, o que corresponde ao estágio 1 da doença (Rezende Filho, 2006).

O segundo estágio envolve a resposta materna com ativação global dos sistemas inflamatórios e a disfunção da célula endotelial. Importantes desequilíbrios bioquímicos têm sido propostos para explicar esta resposta sistêmica materna. Dentre eles, temos o aumento da atividade do tromboxano A₂ (TXA₂) em detrimento da atividade da prostaciclina (PGI₂), a liberação placentária de lipídios peróxidos e o estresse oxidativo (Rezende Filho, 2006).

A lesão renal da pré-eclâmpsia pode ser responsável pela aumentada excreção urinária de proteínas, bem como pela diminuição na filtração glomerular e no clearance de ácido úrico, o último causando a característica hiperuricemia. Visto que o ritmo de filtração glomerular e o clearance de ácido úrico aumentam normalmente durante a gravidez, níveis séricos de creatinina e ácido úrico superiores a 0.9 e 5 mg/dl, respectivamente, são considerados anormais em mulheres grávidas e requerem avaliação complementar (Pascoal *et al.*, 1996).

Diminuição do número de plaquetas e dos níveis de antitrombina III podem preceder a expressão clínica da pré-eclâmpsia. Há também sugestões de que elevações súbitas nos níveis de ferro sérico ou carboxihemoglobina circulantes podem ajudar na diferenciação entre pré-eclâmpsia e outras formas de hipertensão na gravidez (Weiner *et al.*, 1985).

Pode-se assumir que a pré-eclâmpsia é uma doença generalizada, sendo a hipertensão apenas uma de suas manifestações. Observam-se lesões em vários órgãos, incluindo cérebro, fígado e coração. Há também diminuição na perfusão placentária, o que responde, em parte, pela aumentada incidência de retardo de crescimento intra-uterino e de perda fetal (Pascoal, 1998).

1.2 – Endotélio vascular

1.2.1 – Aspectos gerais

O endotélio vascular chegou a ser considerado como uma simples camada unicelular atuando única e exclusivamente como uma barreira semipermeável entre o sangue com seus elementos e o tecido intersticial adjacente.

À luz das mais recentes evidências, demonstra-se que o endotélio vascular apresenta uma significativa gama de propriedades biologicamente ativas, com a participação em inúmeras vias metabólicas. Além das já conhecidas funções especializadas, como aquela que confere propriedade anti-trombogênica à parede dos vasos (Monbouli & Vanhoutte, 1999), ou a que reduz a proliferação e migração de células musculares lisas vasculares e a agregação de monócitos com inibição da expressão de moléculas de adesão (Taddei *et al.*, 2003), sabe-se que o endotélio participa ativamente da regulação da atividade contrátil do músculo liso vascular através de vários mediadores químicos. Dentre esses mediadores químicos temos, os fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e fatores contráteis derivados do endotélio (EDCFs), que juntos desempenham um importante papel na regulação local do tônus vasomotor. Os fatores derivados do endotélio são sintetizados e liberados em resposta a várias substâncias neuro-humorais (acetilcolina, adenosina trifosfato, bradicinina, trombina) bem como, estímulos físicos (Furchgott & Vanhoutte, 1989; Vane *et al.*, 1990).

Os principais EDRF são o NO, a PGI₂ (Moncada & Vane, 1978; Furchgott & Zawadzki, 1980; Palmer *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1988) e o EDHF (Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio) (Furchgott & Vanhoutte, 1989; Komori & Vanhoutte, 1990; Mombouli & Vanhoutte, 1997; Vanhoutte, 1989). A liberação dessas substâncias produz vaso-relaxamento dependente do endotélio em diferentes vasos de diferentes espécies, incluindo aorta de rato (Rapoport & Murad, 1983).

Além dos fatores relaxantes, o endotélio produz vários fatores contráteis, sendo os principais, a prostaglandina H₂ (PGH₂), o TXA₂, a angiotensina II (Ang II), a endotelina-1 (ET-1) e os ânions superóxidos ou espécies reativas de oxigênio (ROS).

Em muitas doenças vasculares, como a hipertensão, diabetes e a aterosclerose, o relaxamento vascular induzido por agonistas em diferentes vasos encontra-se

reduzido (Hongo *et al.*, 1988; Koga *et al.*, 1989; Taddei *et al.*, 1995). Um dos mecanismos propostos para esta disfunção endotelial seria a diminuição na liberação de NO (Barton *et al.*, 1997; Gryglewski *et al.*, 1986).

Dessa forma, o endotélio através da liberação de diferentes mediadores desempenha uma função reguladora local do tônus vasomotor, onde o NO possui papel primordial. Conseqüentemente, uma disfunção no endotélio poderia levar a alterações fisiopatológicas importantes na função de diferentes vasos sanguíneos (Vanhoutte, 1997).

1.2.2 – Óxido nítrico

O NO é um radical livre produzido pela oxidação da L-arginina na presença de oxigênio molecular (O₂), induzida pela NOS, uma enzima que apresenta três isoformas (Li & Forstermann, 2000). São conhecidas a isoforma I (ISO-I) constitutivamente presente em certas células epiteliais, nas células do sistema nervoso central (SNC) e em células neuronais periféricas, a isoforma II (ISO-II) induzível por lipopolissacarídeos e citocinas em uma diversidade de células, em especial nos macrófagos e a isoforma III (ISO-III), a NOS endotelial (NOSe), a forma constitutiva presente nas células endoteliais (Li *et al.*, 2002). Todas as formas utilizam a L-arginina como substrato e necessitam de co-fatores como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, na sua forma reduzida (NADPH), a 6(R)-5,6,7,8-tetraidrobiopterina (BH₄), o dinucleotídeo flavina-adenina (FAD) e a flavina mononucleotídeo (FMN). A atividade da ISO-I e da ISO-III é regulada por cálcio e calmodulina, enquanto que a ISO-II não é ativada por cálcio (Li *et al.*, 2002). A ISO-I participa da regulação tardia da transmissão sináptica no sistema nervoso central, da regulação central da pressão sanguínea, do relaxamento da musculatura lisa e da vasodilatação pela via periférica dos nervos nitrérgicos (Li *et al.*, 2002). A ISO-II está envolvida na fisiopatologia das doenças auto-imunes e do choque séptico e a NOSe produz continuamente pequenas quantidades de NO, que promove vasodilatação, reduz a adesividade plaquetária e leucocitária e inibe a proliferação da musculatura lisa vascular (Forstermann *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2002).

O NO produzido nas células endoteliais, exibe sua atividade nas células do músculo liso vascular relaxando-os através da estimulação da enzima guanilato ciclase (GC) solúvel, com o conseqüente aumento de GMPc, que por sua vez,

estimula a proteína quinase dependente de GMPc (Proteína quinase G – PKG). A PKG pode ativar os canais de K^+ , induzindo hiperpolarização, ou estimular o recrutamento de cálcio para os estoques intracelulares da célula, o que leva a vasodilatação. A PKG pode, ainda, diminuir a sensibilidade da maquinaria contrátil ao cálcio, diminuindo o processo de contração muscular (Rapoport & Murad, 1983).

O NO é o maior contribuinte no relaxamento dependente do endotélio em artérias isoladas incluindo coronária, mesentérica, pulmonar e artérias cerebrais. A inibição da NOS causa vasoconstricção em leito mesentérico e aumento da pressão arterial sistêmica em animais e humanos (Vanhoutte *et al.*, 1995; Moncada *et al.*, 1991).

1.2.3 – Prostaciclina

A PGI_2 é um metabólito do ácido aracdônico produzido pela ciclooxygenase em muitas células vasculares. É formada principalmente em células endoteliais, mas também na camada média e adventícia em resposta ao estresse, hipóxia e a vários outros mediadores que também liberam NO. Esta liberação é dependente de cálcio do retículo sarcoplasmático (Parsaee *et al.*, 1992).

A PGI_2 é, geralmente, descrita como uma substância vasodilatadora derivada do endotélio, entretanto, tem-se observado que a mesma é capaz de evocar respostas contráteis em aorta de coelho (Borda *et al.*, 1983). Neste mecanismo de contração ocorre liberação de fatores constritores derivados do endotélio (Adeagbo & Malik, 1990).

A PGI_2 produzida no endotélio, difunde-se para as células do músculo liso, onde produz a estimulação de receptores específicos de membrana e ativação da adenilato ciclase (AC). Logo em seguida, tem-se um aumento de 3'5'-adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e estimulação da proteína quinase dependente de AMPc (Proteína quinase A – PKA) no músculo liso vascular. A pKA pode ativar canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) induzindo hiperpolarização, além de estimular a saída de cálcio do citosol inibindo a maquinaria contrátil.

Em muitos vasos sanguíneos, a contribuição da PGI_2 para o relaxamento dependente do endotélio é usualmente pequena e o efeito é essencialmente devido ao NO. Além disto, a PGI_2 age sinergicamente com o NO para inibir a agregação plaquetária (Vane, 1994; Moncada *et al.*, 1978).

1.2.4 – Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

Estudos eletrofisiológicos, em várias artérias, demonstram que o relaxamento dependente do endotélio é acompanhado de hiperpolarização das células do músculo liso vascular (Bolton *et al.*, 1984; Félétoú & Vanhoutte, 1988; Nakashima *et al.*, 1993) e que este efeito é resistente a inibidores da NOS e da COX (Nagão *et al.*, 1992). O mecanismo responsável pela hiperpolarização em células do músculo liso induzido pelo EDHF não se encontra totalmente identificado. Por se tratar de uma substância de meia vida curta a sua natureza química ainda não foi identificada.

Evidências experimentais sugerem que a hiperpolarização ocorre devido a ativação de canais de potássio no músculo liso vascular (Brayden, 1990; Chen & Cheung, 1997; Plane & Garland, 1996; Tare *et al.*, 1990). Verifica-se, ainda, que o(s) fator(es) relaxante(s) específico(s) envolvido no relaxamento dependente do endotélio podem variar consideravelmente de acordo com a espécie e o tecido vascular estudado (Triggle *et al.*, 1999).

Os EDRFs podem ativar um ou mais dos pelo menos quatro diferentes canais de potássio, como os de alta condutância (BK_{Ca}), os canais de potássio dependente de ATP (K_{ATP}), canais de potássio de baixa condutância (SK_{Ca}) e canais de potássio dependentes de voltagem (K_v). Em alguns casos, um fator relaxante sozinho pode ativar mais do que uma condutância e, em outros casos, múltiplos tipos de canais de K^+ são simultaneamente afetados pela liberação de mais de um fator relaxante (Waldron & Cole, 1999).

Os canais de potássio apresentam diferenças consideráveis em suas propriedades funcionais; por exemplo, os canais BK_{Ca} são ativados em resposta a despolarização e elevação da concentração intracelular de cálcio, os K_{ATP} são ativados por nucleosídeo difosfato e pela diminuição de ATP intracelular, os SK_{Ca} são ativados por cálcio e os K_v são ativados por voltagem (Waldron & Cole, 1999).

Alguns trabalhos científicos mostram que o relaxamento acompanhado por hiperpolarização no músculo liso, produzido pela acetilcolina (Ach) na presença de inibidores da NOS e da COX, é abolido pela glibenclamida, um bloqueador dos canais de potássio sensível a ATP, em aorta e artéria cerebral de coelho (Brayden, 1990; Cowan *et al.*, 1993), mas não em outras artérias (Murphy & Brayden, 1995a; Chen & Cheung, 1997; Eckman *et al.*, 1998).

Alguns trabalhos mostram que a resposta à Ach pode ser bloqueada tanto pela apamina, um bloqueador de SK_{Ca} , em artéria mesentérica de coelho (Murphy & Brayden, 1995b) e em artéria de oviduto bovina (Garcia-Pascual *et al.*, 1995), como pela caribdotoxina, um bloqueador dos BK_{Ca} , em artéria carótida de coelho (Cowan *et al.*, 1993; Dong *et al.*, 1997). Entretanto, em outros experimentos o bloqueio do efeito vasodilatador de algumas substâncias foi observado apenas quando os dois bloqueadores (caribdotoxina e apamina) foram associados, não se observando nenhum efeito quando testados isoladamente em carótida de cobaia (Corriu *et al.*, 1996a) e em artéria hepática de rato (Zygmunt & Hogestatt, 1996; Zygmunt *et al.*, 1997).

Estes resultados sugerem que múltiplos EDHFs são gerados no endotélio e que os mesmos são responsáveis por ativar distintos canais de potássio, sendo que o tipo de canal de potássio ativado depende do tecido estudado ou da espécie. Dessa forma, a resposta parece envolver pelo menos dois ou mais dos distintos canais de potássio presentes na membrana do músculo liso vascular.

Várias substâncias têm sido relatadas como possíveis fatores que induzem hiperpolarização e, conseqüente, relaxamento no músculo liso vascular, como os ácidos epoxieicosatrienóicos, metabólitos do ácido araquidônico derivados da citocromo P450 monoxigenase (Corriu *et al.*, 1996b), além de anandamida, um derivado do ácido araquidônico suspeito de ser o ligante endógeno dos receptores canabonóides CB1 (Randall *et al.*, 1996). Outros estudos sugerem a adenosina (Olanrewaju *et al.*, 1995), o monóxido de carbono (Furchgott & Jothianandan, 1991), bem como radicais hidroxil e peróxido de hidrogênio (Bény & Von Der Weid, 1991), como sendo capazes de produzir efeitos hiperpolarizantes em preparações vasculares.

Estes estudos, entre diversos outros, utilizando preparações com bloqueadores específicos de canais iônicos demonstram que o efeito do EDHF parece diferenciar-se de acordo com o tecido estudado, dificultando assim, a compreensão de seu exato mecanismo de ação, ainda não conclusivo.

1.2.5 – Função endotelial na pré-eclâmpsia

A disfunção endotelial generalizada é uma das causas da anormalidade clínica que caracteriza a pré-eclâmpsia. Especificamente, a perda do controle do tônus

vascular determinando a hipertensão, aumento da permeabilidade glomerular vascular causando proteinúria, e distúrbios na expressão endotelial de fatores da coagulação resultando em coagulopatias. Demais, esta disfunção endotelial pode conduzir à disfunção hepática. A biópsia renal das pacientes pré-eclâmplicas revela o edemaciamento difuso da célula endotelial glomerular conhecido como “endoteliose capilar glomerular”. O aumento da sensibilidade vascular à Ang-II e o acréscimo na geração de ET-1, assim como na diminuição na produção de alguns vasodilatadores derivados do endotélio, tais como PGI₂ e NO, também têm sido relatados em mulheres com pré-eclâmpsia (Rezende Filho, 2006).

1.3 – Resistência insulínica

1.3.1 - Funções da insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico com peso molecular de 6.000. Possui atividade anabólica e é produzida pelas células beta das ilhotas pancreáticas, cuja síntese é ativada principalmente pelo aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições, mas também por outros fatores como: ácidos graxos livres, potássio, glucagon colecistocinina, acetilcolina, atividade beta-adrenérgica, entre outros. A insulina age em vários tecidos periféricos, incluindo músculo, fígado e tecido adiposo. Seus efeitos metabólicos imediatos incluem: aumento da captação de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo, aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, bem como bloqueio da produção hepática de glicose (via diminuição da neoglicogênese e glicogenólise), da lipólise e da proteólise. Além disso, a insulina tem efeitos tardios na expressão de genes e síntese protéica, assim como na proliferação e diferenciação celulares (Zecchin *et al.*, 2004).

Faz-se necessário conhecer os mecanismos moleculares das vias de sinalização da insulina para que sejam compreendidos os mecanismos pelos quais acontece o desenvolvimento de resistência insulínica.

1.3.2 – Vias de sinalização da insulina

O receptor de insulina é uma proteína de membrana heterotetramérica composta por duas sub-unidades alfa voltadas para o meio extracelular e duas sub-unidades

beta citoplasmáticas com atividade intrínseca de tirosina quinase. A ligação da insulina à sub-unidade alfa permite que a sub-unidade beta adquira atividade quinase, levando à alteração conformacional e a autofosforilação do receptor nas sub-unidades beta em múltiplos resíduos de tirosina (1158, 1162, 1163), aumentando ainda mais sua atividade quinase (Ebina *et al.*, 1985; White *et al.*, 1984; White *et al.*, 1988; Patti *et al.*, 1998).

Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em tirosina. Dentre os dez substratos do receptor de insulina já identificados, quatro pertencem à família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS (White *et al.*, 1998). A fosforilação em tirosina das proteínas IRS acaba por expor sítios de ligação a moléculas contendo domínios SH2. Dentre elas, destaca-se a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85).

A PI 3-quinase é importante na regulação da mitogênese, na diferenciação celular e no transporte de glicose estimulado pela insulina (Folli *et al.*, 1992; Saad *et al.*, 1992; Saad *et al.*, 1993; Shepherd *et al.*, 1995). A enzima catalisa a produção de fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (Lietzke *et al.*, 2000). O fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato liga-se aos domínios PH ("pleckstrin homology") de diversas moléculas sinalizadoras, alterando sua atividade e localização sub-celulares (Lietzke *et al.*, 2000). Além disso, a PI 3-quinase também possui atividade serina-quinase; e como suas duas subunidades podem interagir com outras proteínas sinalizadoras, estudos recentes sugerem que essa enzima pode ser importante na ação da insulina independentemente da produção de fosfatidilinositol-3-4-5-trifosfato (Kessler *et al.*, 2001).

O produto fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato gerado pela PI 3-quinase pode regular a PDK-1 ("phosphoinositide-dependent kinase 1"), uma serina/treonina quinase que fosforila e ativa outra serina/treonina quinase conhecida por Akt ou PKB (Alessi *et al.*, 1997) fosforilando a AS160 permitindo o tráfico do transportador de glicose 4 (GLUT4). Além de fosforilar a Akt, há evidências de que a PDK-1 seja capaz de fosforilar isoformas atípicas da PKC (α e β) envolvidas na síntese protéica e no transporte de vesículas de GLUT4 para a membrana celular para promover a captação de glicose (Kim *et al.*, 1999; Kitamura *et al.*, 1998; Bandyopadhyay *et al.*, 1997; Kohn *et al.*, 1996; Kotani *et al.*, 1998).

No jejum, GLUT4 é continuamente reciclado entre a membrana celular e os vários compartimentos intracelulares. Na presença do estímulo da insulina, a taxa de exocitose das vesículas contendo GLUT4 aumenta intensamente, além de ocorrer pequena redução da taxa de internalização.

A insulina também estimula a via da MAPK, que se inicia com a fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc, que interagem com a proteína Grb2 (Paez-Espinosa et al., 1999). O bloqueio farmacológico dessa via previne a ação da insulina no crescimento celular, mas não tem efeito nas ações metabólicas do hormônio (Lazar et al., 1995). Estudos demonstram que a ativação da via da MAP quinase pela insulina não está reduzida no diabetes do tipo 2 e em outros estados de resistência à insulina, podendo até mesmo estar aumentada (Cusi et al., 2000; Jiang et al., 1999; Zecchin et al., 2003). Possivelmente assim a hiperinsulinemia crônica, à qual os tecidos estão expostos nesses estados, exerceria efeitos deletérios sobre o crescimento celular na vasculatura, resultando em doença cardiovascular.

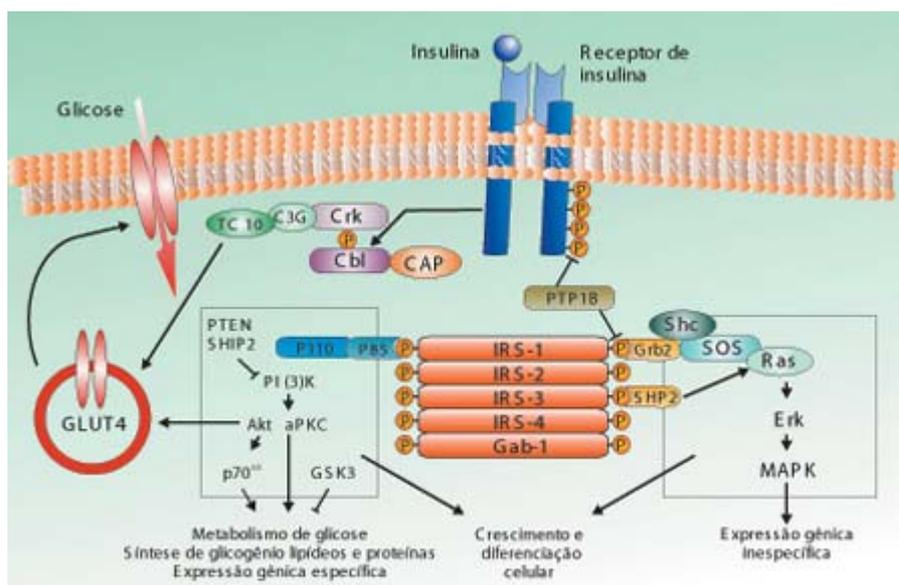


Figura 1. Vias de sinalização da insulina. (APUD Saltiel & Kahn., 2001)

1.4- Considerações sobre prevenção na pré-eclâmpsia

A descoberta da prevenção da pré-eclâmpsia revolucionaria o acompanhamento pré-natal e salvaria muitas vidas maternas e fetais, principalmente em países subdesenvolvidos, onde as conseqüências da pré-eclâmpsia são devastadoras. No

passado, a restrição dietética de sal e a administração profilática de diuréticos foram utilizadas com esta finalidade. Entretanto, não há evidências consistentes de que a limitação de sódio dietético modifica a incidência ou intensidade de pré-eclâmpsia e as orientações nutricionais atuais para gestantes recomendam conteúdo normal de sal. Uma meta-análise de estudos randomizados de mais de 7000 mulheres encontrou semelhante incidência de pré-eclâmpsia entre pacientes que receberam diurético profilático e placebo (Collins *et al.*, 1985).

Algumas tentativas para prevenção da pré-eclâmpsia surgiram recentemente: baixa dose de aspirina, suplementação dietética com cálcio, suplementação com complexo B, suplementação com vitaminas C e E, suplementação com L-arginina, atividade física e uso de sildenafil (Rezende Filho, 2006). Quanto à suplementação com baixas doses de aspirina (50-150 mg/dia), apesar dos muitos estudos neste assunto, a relação entre aspirina e um risco reduzido de pré-eclâmpsia, em mulheres consideradas de alto risco, permanece um assunto não muito claro. A premissa para o benefício da aspirina era que, nestas doses, a aspirina inibiria a produção de TXA₂ mais do que a de PGI₂, mantendo ou restabelecendo a predominância funcional da PGI₂, uma prostaglandina vasodilatadora (Pascoal, 1998). A realização de um grande estudo, envolvendo mais de 9.000 pacientes, não confirmou vantagens no uso de aspirina em baixas doses (60 mg/dia), embora sugerisse a possibilidade de que pacientes com alto risco pudessem eventualmente se beneficiar (CLASP, 1994).

Entretanto, um estudo brasileiro subsequente não demonstrou qualquer benefício profilático da aspirina, mesmo em pacientes consideradas de alto risco para desenvolver pré-eclâmpsia (ECCPA, 1996). Porém, Coomarasamy *et al* (2003) citando a revisão Cochrane sobre 39 investigações randomizadas com mais de 30.000 mulheres, referem que o uso profilático de aspirina foi capaz de reduzir a incidência de pré-eclâmpsia em 15%, a de morte fetal e neonatal em 14%, a de parto pré-termo em 8%, não havendo nenhum efeito na taxa de CIR.

A hipótese de que baixa ingestão de cálcio na dieta está associada à hipertensão em geral e à pré-eclâmpsia em particular, motivou estudos de suplementação oral de cálcio para prevenir pré-eclâmpsia. Uma meta-análise (Bucher *et al.*, 1996) destes estudos sugeriu que a suplementação era benéfica, embora houvesse dados conflitivos (Roberts *et al.*, 1996). A conclusão de um grande estudo randomizado, patrocinado pelo National Institute of Health dos Estados Unidos, demonstrou

claramente que a suplementação dietética de 2 g/dia de cálcio não está indicada, pelo menos para mulheres americanas, se o objetivo for reduzir a incidência de pré-eclâmpsia ou melhorar o bem-estar fetal (Richard *et al.*, 1997).

Schnyder *et al.* (2002) propõem para baixar os níveis de homocisteína o ácido fólico na dose de 1 mg/dia, vitamina B₁₂, 400ug/dia e a vitamina B₆, 10 mg/dia. Wacker *et al.* (2000) verificaram que a deficiência de riboflavina (vitamina B₁₂) na gravidez aumenta o risco de pré-eclâmpsia de 4,7 vezes, sugerindo o seu uso profilático, especialmente em populações com deficiência alimentar. Quanto ao uso de vitamina C e E, os dados são contraditórios. Chappel *et al.* (1999) mostrou que quando são administradas diariamente 1000mg de vitamina C e 400UI de vitamina E desde o início da gravidez (16-20 semanas) até o parto, a incidência de pré-eclâmpsia reduziu mais de 50%. Porém o mesmo não foi observado por Beazley *et al.* (2005).

Germain *et al.* (2004) avaliaram o benefício da suplementação crônica com L-arginina, em mulheres grávidas com história de desordens placentárias (pré-eclâmpsia, abortamento, natimortalidade, parto pré-termo). O prognóstico perinatal foi melhor e a incidência de pré-eclâmpsia menor após a suplementação com a L-arginina, a se comparar à gestação anterior dessas pacientes.

A escassez de opções para prevenção e terapêutica, aliada ao fato de que dano e disfunção endotelial, resistência insulínica, defeitos de coagulação e resposta inflamatória sistêmica exacerbada ocorrem na pré-eclâmpsia (Rodie *et al.*, 2004); que na hipertensão induzida pela gravidez há aumento do estresse oxidativo (Roberts *et al.*, 2004), hiperatividade do sistema simpático (Schobel *et al.*, 1996) e aumento da reatividade vascular (Gant *et al.*, 1973); e que o Extrato de Casca de Uva (GSE) tem efeitos anti-hipertensivo, vasodilatador dependente de endotélio e propriedades anti-oxidantes, ações estas, aliadas à liberação de NO e EDHF (Soares de Moura R *et al.*, 2002; Frota Madeira SV *et al.*, 2005), nos incitaram a testar o GSE em um modelo experimental de hipertensão, induzida por L-NAME (inibidor da NOS), na gravidez e seus possíveis efeitos protetores.

1.5 – Modelos experimentais de pré-eclâmpsia

Muitos modelos experimentais de pré-eclâmpsia já foram utilizados. A isquemia uterina em animais de experimentação, por meio de clamp em artéria aorta

abdominal, leva a um quadro similar à pré-eclâmpsia (Podjarny *et al.*, 1999). A nefropatia causada pela administração de adriamicina induz a aumento da pressão arterial, proteinúria, diminuição da taxa de filtração glomerular e razão tromboxano B₂ / prostaglandina E₂ glomerular aumentada (Podjarny *et al.*, 1999). A indução de quadro de hiperinsulinemia, através da implantação de um pellet de liberação sustentada de insulina, leva a hipertensão, retenção renal de sódio, aumento da atividade simpática e crescimento da musculatura lisa vascular (Podjarny *et al.*, 2001). O aumento crônico da atividade simpática, por estimulação do gânglio celíaco com lipolissacarídeo bacteriano ou cloreto de potássio, produz um quadro similar a síndrome HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets) (Podjarny *et al.*, 1999). A inibição da NOS produz hipertensão, vasoconstricção renal levando a um declínio na taxa de filtração glomerular, proteinúria, e aumento da morbidade e mortalidade materna e fetal (Podjarny *et al.*, 1999).

Para nossos estudos experimentais sobre a ação protetora materno-fetal do GSE na pré-eclâmpsia, resolvemos usar o modelo de pré-eclâmpsia induzida pelo L-NAME, visto que grande parte dos modelos experimentais de pré-eclâmpsia têm como componente fundamental a disfunção endotelial (Podjarny *et al.*, 1999).

1.6 – Características gerais das uvas

A uva é o fruto da videira ou vinha, planta que possui a seguinte classificação na sistemática botânica:

Tabela 1 – Classificação das uvas na sistemática botânica.

ORDEM	Ramnídea
FAMÍLIA	Vitácea
SUB-FAMÍLIA	Ampelídea
GÊNERO	<i>Vitis</i>
SUB-GÊNERO	<i>Euvinis</i>

Existe, ainda, a classificação de acordo com as espécies que podem ser inúmeras, tais como, *Vitis vinifera*, *V. rupestris*, *V. aestivalis*, *V. labrusca*, *V.*

riparia, *V. cinérea*, etc. Cada uma dessas espécies possui muitas variedades, denominadas cepas ou castas.

As uvas que originam os vinhos finos, considerados os melhores, são da espécie *V. vinifera* de origem européia e que possui inúmeras castas, como a Cabernet Sauvignon, a Merlot, a Chardonnay, etc. As demais espécies são denominadas americanas, sendo adequadas à elaboração de vinhos de mesa, vinho colono, vinho de garrafão e suco de uva. Essas espécies também possuem muitas variedades, cujos melhores exemplos no Brasil são a Niágara e a Isabel que até a década de 80 eram as únicas castas utilizadas na elaboração dos vinhos brasileiros.

As uvas Isabel, da espécie denominada *V. labrusca*, caracterizam-se por serem mais robustas e resistentes. Estas uvas são largamente cultivadas no Sul do Brasil, juntamente com as uvas *V. viníferas* que nos últimos anos vêm crescendo significativamente para a produção de vinhos tintos brasileiros (Soares de Moura, 2003).

1.7 – Características gerais dos polifenóis

O GSE é um extrato hidro-alcoólico da casca de uvas viníferas, *Vitis labrusca* da variedade Isabel, rico em polifenóis. Polifenóis podem ser definidos como substâncias aromáticas, de origem natural, que podem conter uma ou mais hidroxilas (Waterhouse, 2002) e são encontrados em muitos alimentos de origem natural. Dentre estes alimentos, um dos mais ricos são as uvas viníferas. Os polifenóis podem ser agrupados em duas categorias, designadas flavonóides e não-flavonóides. Os flavonóides compreendem a maioria dos polifenóis derivados da casca da uva vinífera. Eles podem ser definidos como compostos que contém um sistema formado por três anéis, sendo que dois anéis são aromáticos. De acordo com o grau de oxidação os flavonóides podem ser classificados em diversas subclasses, sendo as três maiores, as dos flavanóis (ex: catequina e epicatequina), flavonóis (ex: quercetina e kaempferol) e das antocianinas e/ou antocianidinas (ex: malvidina-3-glucosídeo e delfinidina). Os não flavonóides, podem ser classificados em ácidos hidroxinâmicos (ex: ácido caféico), ácidos benzóicos (ex: ácido gálico), taninos hidrolizáveis (ex: vescaligina) e estilbenos (ex: resveratrol) (Waterhouse, 2002).

A concentração dos polifenóis pode variar de acordo com o tipo de uva e a região que é cultivada. A concentração total de polifenóis nas uvas viníferas,

extraídos pelo método de Follin-Ciocalteu, pode variar entre 1,2 a 4,1 g/Kg (Mattivi et al., 2002). Acredita-se, ainda, que a concentração das substâncias presentes nas uvas, pode variar de acordo com alterações climáticas, como exposição a luz solar (Price et al., 1995).

Em estudos previamente realizados, detectamos que o GSE liofilizado tem uma concentração de fenóis, pelo método de Follin-Ciocalteu, de 55,5 mg/g. As partes da uva que são mais ricas em polifenóis são a casca e o caroço, porém como a casca responde por um maior volume da uva que o caroço, fica mais vantajoso, economicamente, usá-la.

2 – OBJETIVO

2.1 - Objetivo geral

Avaliar o efeito protetor materno-fetal do GSE na redução das condições patológicas semelhantes a pré-eclâmpsia, provocadas pela inibição da síntese de NO durante a gestação, induzida pelo tratamento de ratas grávidas com L-NAME .

2.2 – Objetivos específicos

1) Avaliar o efeito protetor do GSE no desenvolvimento de hipertensão durante a gravidez, causada pelo tratamento com L-NAME em ratas grávidas.

2) Analisar a ação protetora do GSE na redução do número de fetos vivos por ninhada, causada pela inibição da NOS durante a gestação em ratas.

3) Comparar o número total de fetos por ninhada e a massa dos fetos vivos ao final da gravidez entre ratas controle, tratadas com L-NAME, com L-NAME + GSE e apenas com GSE.

4) Verificar a interferência do GSE na resistência insulínica causada pela administração de L-NAME durante a gestação em ratas.

5) Comparar o ganho ponderal durante a gravidez entre ratas controle, tratadas com L-NAME, com L-NAME + GSE e apenas com GSE.

3 - MATERIAL E MÉTODOS.

3.1 - Animais utilizados

Todos os experimentos foram revisados e aprovados pela Comissão de Ética de Experimentos Animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. O experimento foi feito com ratas Wistar obtidas no biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Todos os animais tiveram livre acesso à ração e água e foram mantidos em ciclos de sono-vigília de 12 horas com uma temperatura ambiente constante de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. No dia zero da gravidez, ratas fêmeas virgens (200-250g) com aproximadamente 12 semanas, foram mantidas na mesma gaiola por uma noite com ratos machos maduros (04 fêmeas e 02 machos por gaiola). Na manhã seguinte, as fêmeas foram separadas dos machos. Passado 13 dias, apenas as fêmeas que obtiveram ganho ponderal foram consideradas grávidas.

3.2 - Tratamento

Todas as fêmeas receberam água e alimento *ad libitum* do dia zero até o 13º dia da gestação. O Grupo Controle-Grávida (C-G) continuou recebendo água e comida *ad libitum* até o dia 20 da gestação. O Grupo L-NAME-Grávida (L-NAME-G) foi tratado com L-NAME (N^{G} -nitro-L-arginine methyl ester, SIGMA MO, USA), um inibidor da NOS, (aproximadamente 60 mg/kg/dia) diluído na água de beber, do dia 13 ao dia 20 da gestação. O Grupo L-NAME-GSE-Grávida (L-NAME+GSE-G) foi tratado com L-NAME (aproximadamente 60 mg/kg/dia) mais GSE (aproximadamente 200 mg/kg/dia) diluídos na água de beber do dia 13 ao dia 20 da gestação. O Grupo GSE-Grávida (GSE-G) foi tratado com GSE (aproximadamente 200 mg/kg/dia) diluído na água de beber do dia 13 ao dia 20 da gestação. No vigésimo dia de gestação, foram registrados o ganho ponderal durante a gestação e a pressão arterial; foram feitos o clampeamento glicêmico e análise do número total de fetos e massa dos fetos vivos. Além desses grupos, foram feitos o Grupo Controle-Não-Grávida (C-NG) e o Grupo L-NAME-Não-Grávida (L-NAME-NG), os quais receberam, respectivamente, apenas água e L-NAME (aproximadamente 60 mg/kg/dia) durante sete dias com a pressão arterial medida no sétimo dia. As

soluções de L-NAME e GSE foram preparadas a cada dois dias. A ingestão diária de água por rato (aproximadamente 45 ml por dia) foi medida a cada dois dias, durante o período do dia 1 ao dia 20 da gestação, e a concentração de L-NAME e GSE na água de beber foi calculada de forma a manter a ingestão diária das doses de L-NAME (aproximadamente 60 mg/kg/dia) e GSE (aproximadamente 200 mg/kg/dia). A possibilidade de reação química entre o GSE e o L-NAME, causando mudanças no L-NAME presente na solução, foi descartada, pois testes com HPLC mostraram que as concentrações de L-NAME na água de beber não modificaram após 72 horas. Testes com HPLC não detectaram L-arginina no GSE.

3.3 - Preparação do extrato de casca de uva (GSE)

Uvas *Vitis labrusca* da variedade Isabel foram obtidas de viticulturas selecionadas, localizadas no estado brasileiro do Rio Grande do Sul. As uvas foram lavadas em água corrente e as cascas foram separadas das polpas. Aproximadamente 100g de cascas de uva foram fervidas em 400ml de água destilada por 5 minutos e posteriormente o preparado foi triturado. Na etapa seguinte, 400ml de etanol foram adicionados ao decoto, a solução foi homogeneizada por 4 horas e acondicionada em frasco de vidro de cor escura e este mantido no refrigerador a 4°C por 20 dias. Um extrato hidro-alcoólico de casca de *V. labrusca* foi então obtido e posteriormente filtrado através de filtro de papel Whatman nº 1. O etanol foi evaporado, em regime de baixa pressão a 55°C, e o extrato liofilizado e congelado a -20°C até o seu uso. Constatou-se que para cada 100 g de cascas de uva, obtinha-se a formação de cerca de 8,9 g de extrato liofilizado.

3.4 - Registro de pressão arterial

Pressões arteriais sistólica, média e diastólica, foram aferidas ao menos três vezes, antes do dia do experimento, visando acostumar o animal ao procedimento e diminuir o nível de estresse. Utilizou-se um aparelho da marca Letica LE 500, que mede a pressão arterial de forma não-invasiva, na cauda do animal. No dia do experimento, as primeiras medidas de pressão arterial foram descartadas e a média de cinco medidas subsequentes foi registrada.

3.5 Clampeamento glicêmico, avaliação da glicemia, insulinemia e sensibilidade à insulina

A sensibilidade à insulina foi analisada da seguinte forma. No vigésimo dia de gestação, após um jejum de 06 horas, o animal foi anestesiado com 20 mg/kg ip de xylazina (Rompum® Bayer SA, São Paulo, Brazil) mais 40 mg/kg ip de pentobarbital (Hypnol, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brazil). Depois da estabilização da anestesia, foi inserido um cateter na veia femoral e outro na artéria carótida. O cateter da artéria carótida foi usado para colher as amostras de sangue e o da veia femoral para infusão. Os animais receberam uma infusão de glicose através de uma bomba de infusão contínua (9,92 µg/g/min) durante 60 minutos. Amostras de sangue contendo 0,5 ml foram coletadas no tempo zero, imediatamente antes do início da infusão de glicose e 15, 30, 45 e 60 minutos após o começo da infusão. As amostras foram colocadas em ependorffs heparinizados e centrifugados (3000 rpm) por 2 minutos. O plasma foi separado e refrigerado a -70°C para posterior análise da glicemia e insulinemia pelo método da glicose oxidase e radioimunoensaio (RIA¹²⁵/KIT), respectivamente. Após à coleta e centrifugação de cada amostra, as mesmas foram repostas com soro fisiológico, até o volume inicial, e re-injetadas no animal. Sempre que o cateter era usado para colher ou re-injetar amostras de sangue, era posteriormente heparinado.

3.6 - Registro da massa e número dos fetos vivos e número total de fetos

Após o clampeamento, com o animal anestesiado e respirando espontaneamente, o útero da mãe foi aberto e retirados todos os fetos. A massa dos fetos vivos foi aferida pelo método de Scherle. Para identificar se o feto estava vivo na hora do parto, foi feito um acesso torácico e analisado se havia batimento cardíaco. Os fetos em que não foi identificado batimento cardíaco, foram considerados mortos no momento do parto.

3.7 - Análises estatísticas

Todos os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média do número de ratos. Foi utilizado ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni para a

análise estatística da pressão arterial, massa fetal, ganho ponderal materno, número total de fetos e número de fetos vivos e ANOVA para medidas repetidas seguida de pós-teste de Bonferroni para a glicemia, insulinemia e razão insulina/glicose. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4- RESULTADOS

4.1 - Ganho ponderal durante a gestação

O grupo C-G teve um ganho ponderal de 84 ± 3 g (n=10), enquanto no grupo L-NAME-G foi de 70 ± 5 g (n=10), no grupo L-NAME+GSE-G foi de 75 ± 3 g (n=8) e no grupo GSE-G foi de 84 ± 4 g (n=9). Estes resultados não demonstraram diferença significativa de ganho ponderal entre os grupos (Fig. 2).

4.2 - Pressão arterial sistólica, média e diastólica ao final da gestação

A pressão das ratas não grávidas tratadas com L-NAME medidas 7 dias após o início do tratamento (sistólica: 157 ± 7 mmHg, média: 119 ± 12 mmHg, diastólica: 101 ± 15 mmHg, n=8) foi significativamente maior ($P < 0,05$) que das ratas não grávidas controle (sistólica: 100 ± 3 mmHg, média: 65 ± 5 mmHg, diastólica: 48 ± 8 mmHg, n=8) (Fig. 3). O tratamento das ratas grávidas com L-NAME induziu um aumento significativo da pressão arterial (sistólica: 140 ± 9 mmHg, média: 107 ± 6 mmHg, diastólica: 91 ± 7 mmHg, n=9), quando comparado com as ratas grávidas controle (sistólica: 105 ± 8 mmHg, média: 77 ± 7 mmHg, diastólica: 63 ± 7 mmHg, n=8) (Fig.3). O aumento da pressão arterial induzido pelo L-NAME nas ratas grávidas (L-NAME-G) foi significativamente ($P < 0,05$) inibido quando o GSE foi administrado simultaneamente com L-NAME (L-NAME+GSE-G) (sistólica: 94 ± 7 mmHg, média: 69 ± 9 mmHg, diastólica: 57 ± 11 mmHg, n=8) (Fig. 3). A pressão arterial das ratas grávidas tratadas com GSE (GSE-G) (sistólica: 88 ± 5 mmHg, média: 61 ± 6 mmHg, diastólica: 47 ± 7 mmHg, n=9) não foi significativamente diferente dos grupos C-G ou L-NAME+GSE-G (Fig. 3). Além disso, a pressão arterial do grupo C-NG não foi significativamente diferente do grupo C-G (Fig. 3). Os níveis de pressão arterial no grupo L-NAME-NG tendeu a ser maior que os níveis de pressão arterial do grupo L-NAME-G, entretanto, não houve diferença significativa entre os valores (Fig. 3).

4.3 - Glicemia, insulinemia e sensibilidade à insulina

A infusão de glicose induziu um aumento constante da glicemia nos grupos C-G, L-NAME-G e L-NAME+GSE-G (Fig. 4). Entretanto, a glicemia do grupo C-G, em todos os tempos, foi significativamente ($P < 0,05$) mais alta do que a dos grupos L-NAME-G e L-NAME+GSE-G, sendo que os dois últimos não apresentaram diferença significativa entre si em nenhum tempo (Fig. 4).

A insulinemia basal, exatamente antes do início da infusão de glicose, não foi significativamente diferente entre os grupos C-G ($34,6 \pm 2,4 \mu\text{U/ml}$, $n=5$), L-NAME-G ($28,0 \pm 4,6 \mu\text{U/ml}$, $n=5$) e L-NAME+GSE-G ($20,5 \pm 1,6 \mu\text{U/ml}$, $n=5$) (Fig. 5). Entretanto, durante a infusão de glicose, a insulinemia do grupo L-NAME-G atingiu níveis significativamente maiores ($P < 0,05$) em t15 ($58,3 \pm 11 \mu\text{U/ml}$, $n=5$) em relação aos grupos L-NAME+GSE-G ($21,5 \pm 4 \mu\text{U/ml}$, $n=5$) e C-G ($29,6 \pm 3 \mu\text{U/ml}$, $n=5$) e em t30 ($44,4 \pm 7 \mu\text{U/ml}$, $n=5$) em relação ao grupo L-NAME+GSE-G ($20,2 \pm 4 \mu\text{U/ml}$, $n=5$) (Fig. 5).

A relação insulina /glicose do grupo L-NAME-G (t15: $0,41 \pm 0,07$, $n=5$) foi significativamente mais alta ($P < 0,05$) que no grupo L-NAME+GSE-G (t15: $0,13 \pm 0,03$, $n=5$) e C-G (t15: $0,11 \pm 0,01$, $n=5$) em t15, mostrando que a resistência insulínica provocada pelo tratamento com L-NAME foi inibida pelo tratamento com o GSE (Fig. 6). Em adição, a relação insulina/glicose observada no grupo C-G não foi significativamente diferente da do grupo L-NAME+GSE-G (Fig. 6).

4.4 - Número de fetos vivos por ninhada, massa dos fetos vivos e número total de fetos por ninhada

O número de fetos vivos por ninhada no grupo L-NAME-G ($4,9 \pm 1,9$, $n=8$) foi significativamente menor que o observado nos grupos C-G ($10,3 \pm 1,3$, $n=8$), L-NAME+GSE-G ($9,1 \pm 1,3$, $n=8$) e GSE-G ($9,3 \pm 1,3$, $n=8$) (Fig. 7).

O número total de fetos por ninhada não foi significativamente diferente entre os quatro grupos.

A massa dos fetos vivos não foi significativamente diferente entre os quatro grupos (Fig. 8).

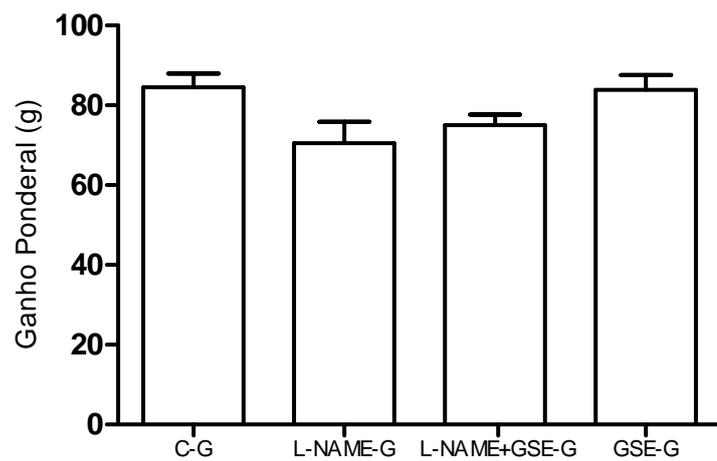


Figura 2 – Ganho ponderal entre o dia zero e o vigésimo dia da gravidez dos grupos C-G, L-NAME-G, L-NAME+GSE-G e GSE-G. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni).

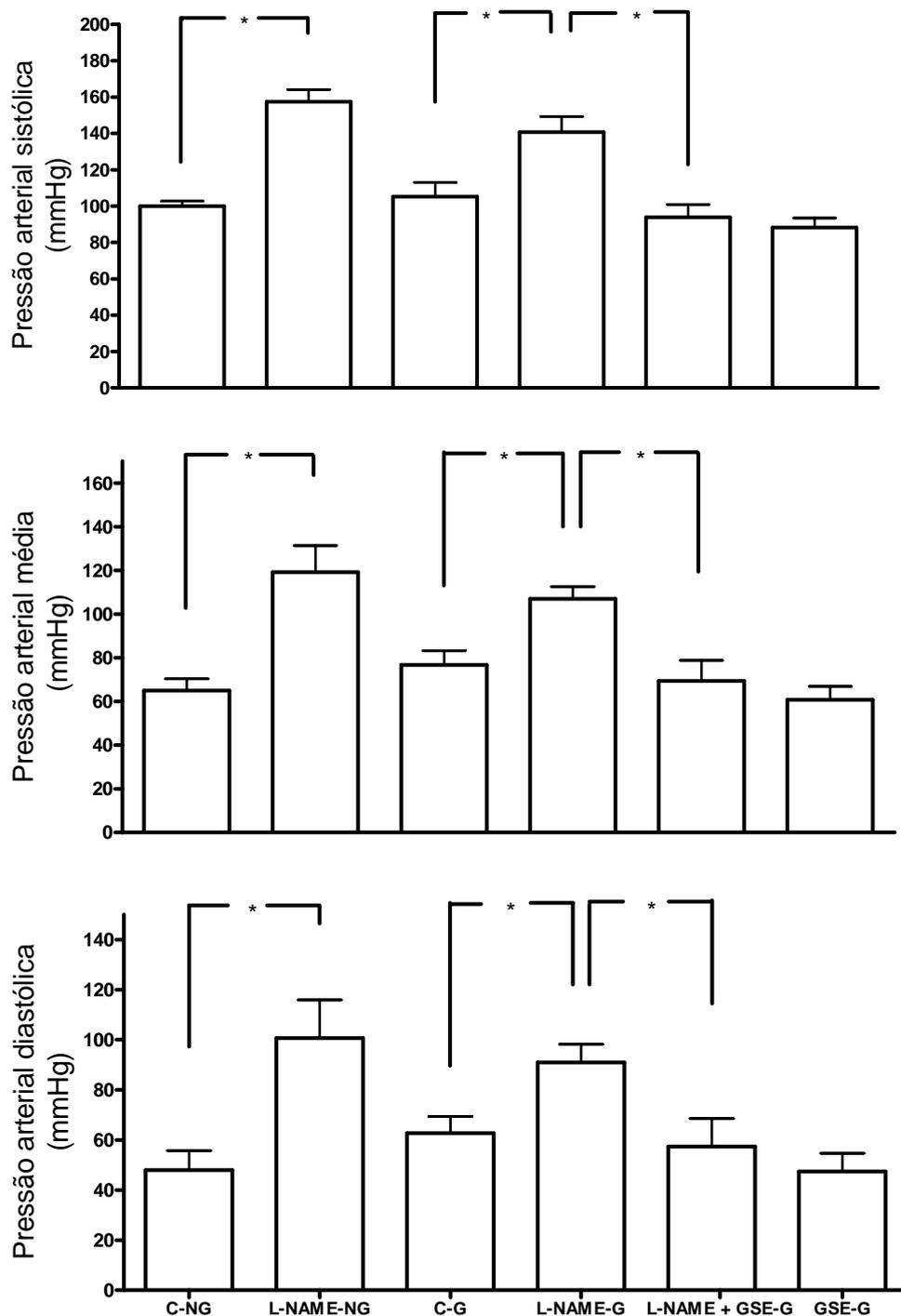


Figura 3 – Pressão arterial sistólica, média e diastólica das ratas não tratadas (controle) e tratadas com L-NAME, GSE ou GSE + L-NAME. Os dados representam a média \pm erro padrão da média da pressão arterial sistólica, média e diastólica medida no vigésimo dia de gravidez. O * denota $P < 0,05$ (ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni).

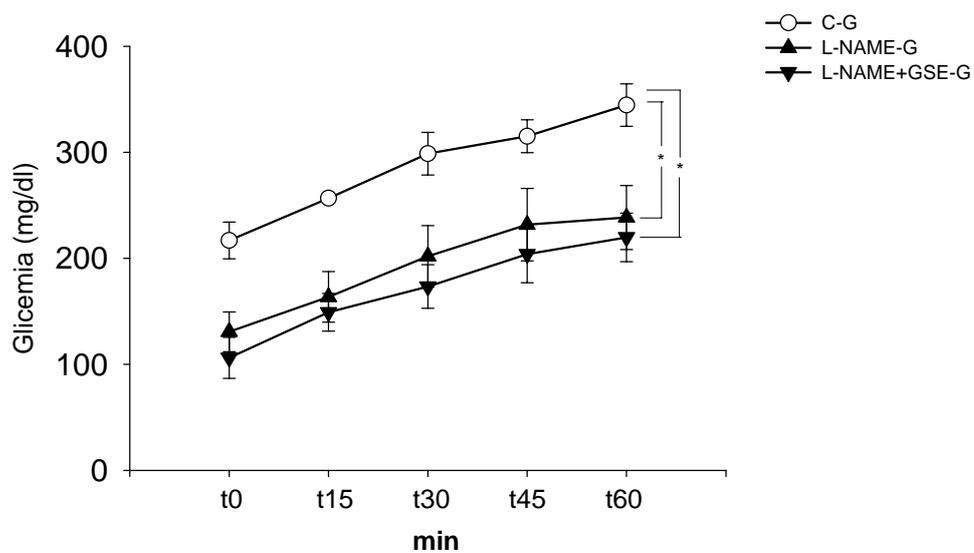


Figura 4 – Glicemia dos grupos C-G, L-NAME-G e L-NAME+GSE-G imediatamente antes da infusão de glicose e 15, 30, 45 e 60 minutos depois do início da infusão. Os valores apresentados são média \pm erro padrão da média. A glicemia do grupo controle foi estatisticamente superior à dos outros grupos em todos os tempos. * $P < 0,05$ (ANOVA para medidas repetidas, seguida de pós-teste de Bonferroni).

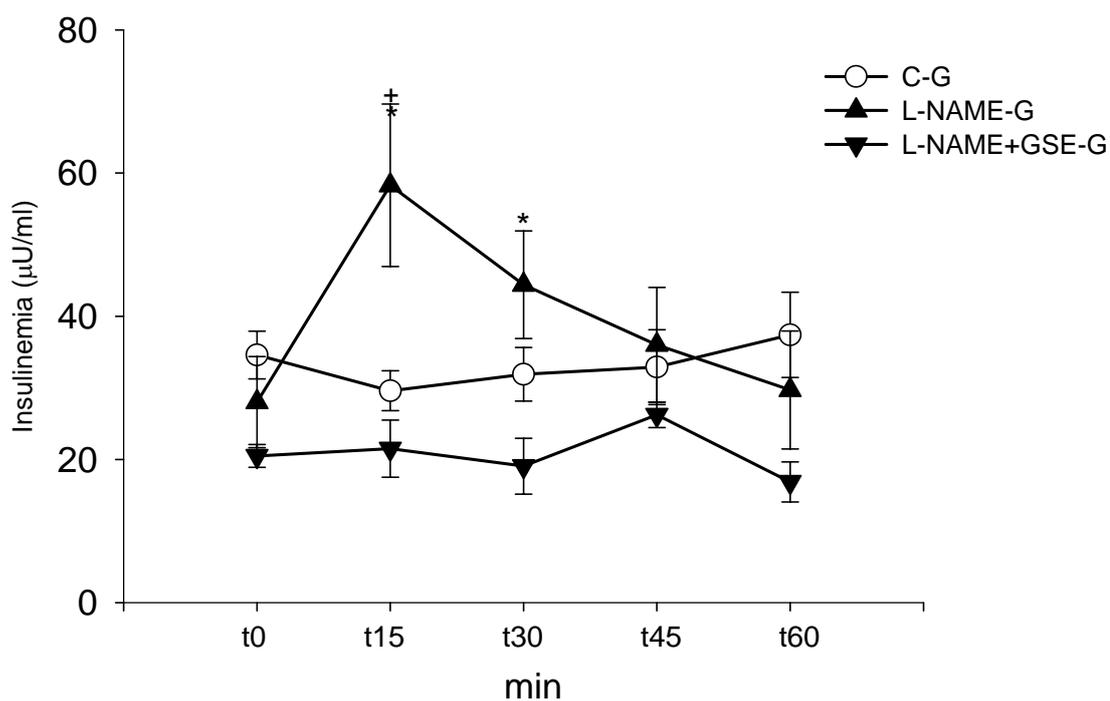


Figura 5 – Insulinemia dos grupos C-G, L-NAME-G e L-NAME+GSE-G imediatamente antes da infusão de glicose e 15, 30, 45 e 60 minutos depois do início da infusão. Os valores apresentados são média \pm erro padrão da média. A insulinemia do grupo L-NAME-G foi estatisticamente superior à dos outros grupos em t15 e superior à do grupo L-NAME+GSE-g em t30, [†]* $P < 0,05$ (ANOVA para medidas repetidas, seguida de pós-teste de Bonferroni).

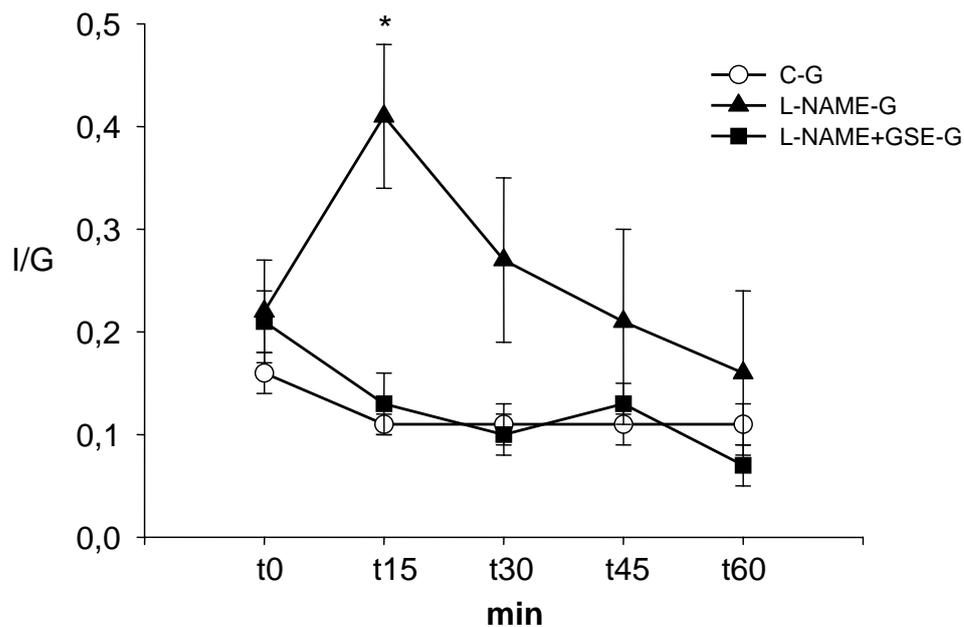


Figura 6 – Razão insulina/glicemia dos grupos C-G, L-NAME-G e L-NAME+GSE-G imediatamente antes da infusão de glicose e 15, 30, 45 e 60 minutos depois do início da infusão. Os valores apresentados são média \pm erro padrão da média. A razão insulina/glicemia do grupo L-NAME-G foi estatisticamente superior à dos outros grupos em t15, $*P < 0,05$ (ANOVA para medidas repetidas, seguida de pós-teste de Bonferroni).

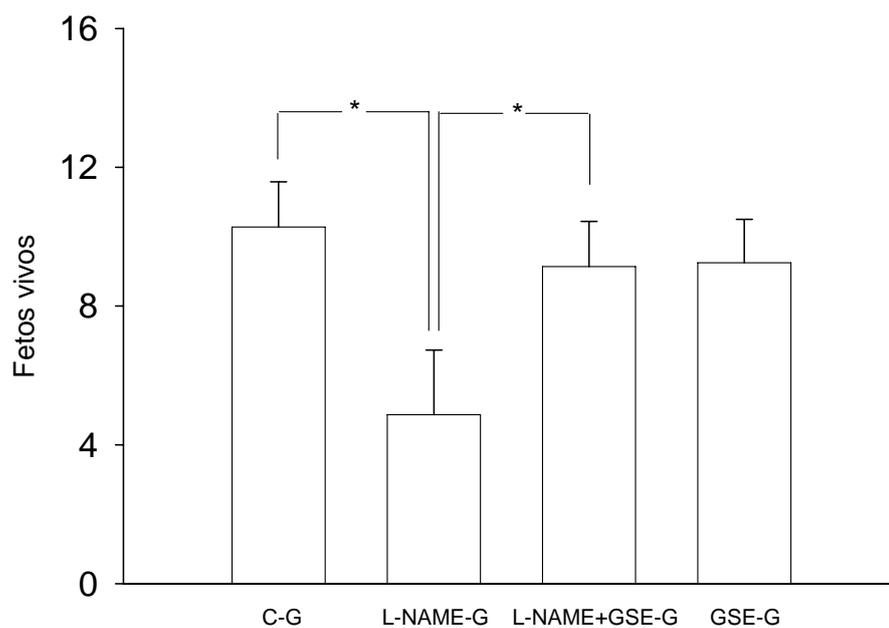


Figure 7: Número de fetos vivos por ninhada dos grupos C-G, L-NAME-G, L-NAME+GSE-G e GSE-G. Os valores apresentados são média \pm erro padrão da média. O número de fetos vivos do grupo L-NAME-G foi significativamente menor do que o dos outros grupo e não houve diferença significativa entre o grupo C-G e os grupos L-NAME+GSE-G e GSE-G, $*P < 0,05$ (ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni).

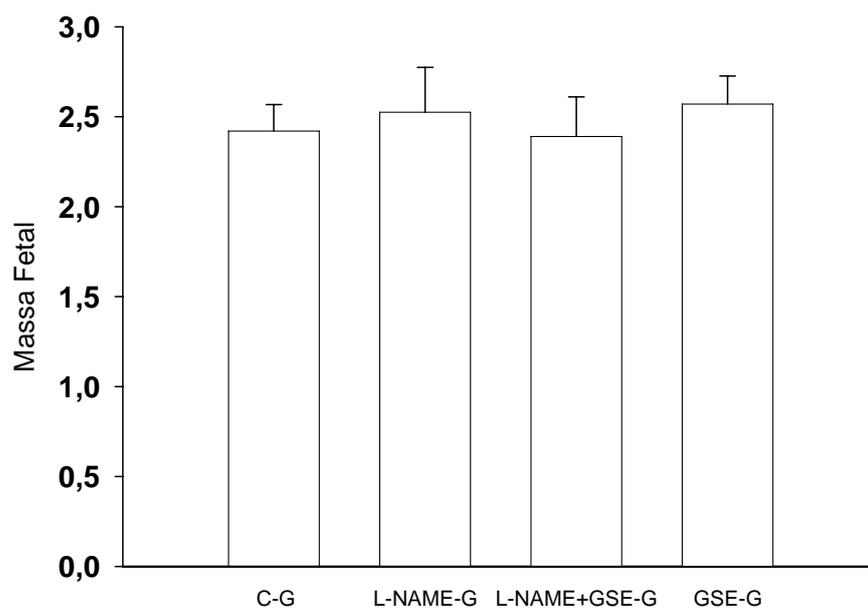


Figure 8: Massa dos fetos vivos dos grupos C-G, L-NAME-G, L-NAME+GSE-G e GSE-G. Os valores apresentados são média \pm erro padrão da média. Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni).

5 - DISCUSSÃO

Os presentes resultados demonstram que a inibição da NOS durante a gravidez induz a um aumento na pressão arterial e aparecimento de resistência insulínica em ratas grávidas, além de ter efeito deletério nos fetos. A elevação da pressão arterial durante a gravidez, pelo L-NAME (Baylis *et al.*, 1992; Yallampalli *et al.*, 1993; Molnar *et al.*, 1994), sugere que a inibição da NOS é um método útil de indução a um modelo experimental de pré-eclâmpsia. Em ratas grávidas, o aumento da pressão arterial, induzido pela inibição da NOS, mostrou-se mais atenuado que o aumento em ratas não-grávidas, resultado este, similar aos achados prévios (Umans *et al.*, 1990). Isso sugere outro importante sistema biológico, como uma acentuação da liberação de PGI₂ (Magness *et al.*, 1991) e do decréscimo na produção de TXA₂ (Walsh *et al.*, 1985) na gravidez normal (Buhimschi *et al.*, 1998). O NO, na gravidez normal, tem um importante papel na adaptação cardiovascular, já que a via L-arginina-NO-cGMP está acentuada nesta condição (Conrad *et al.*, 1993). O NO desempenha uma importante função na diminuição da resistência vascular periférica e na redução da resposta pressora a certos agonistas, como a angiotensina II visto que a inibição da NOS aumenta a pressão arterial e a resposta pressora da Ang-II na gravidez normal (Molnár *et al.*, 1992).

O aumento da pressão arterial induzido pelo L-NAME na gravidez é devido à redução da liberação de NO, pois ratas grávidas tratadas com L-NAME têm um decréscimo da excreção urinária de nitrato (Podjarny *et al.*, 2001). A hipertensão induzida por L-NAME em ratas grávidas provavelmente é independente da ET-1 e do TXA₂, já que não é inibida pelo bosertan, um inibidor do receptor de ET-1 (Wight *et al.*, 1998), ou pelo daltroban, um antagonista do receptor de TXA₂ (Podjarny *et al.*, 2001). Nós mostramos que o GSE, um extrato que induz relaxamento dependente de endotélio em vasos isolados tem efeito anti-hipertensivo na hipertensão experimental (Soares de Moura *et al.*, 2002; Frota Madeira *et al.*, 2005), além de significativa redução do aumento da pressão arterial em ratas grávidas tratadas com L-NAME. Nossos resultados são similares a achados prévios que mostram que moxonidina (Gairard *et al.*, 2004), metildopa e diltiazem (Podjarny *et al.*, 2001), compostos anti-hipertensivos normalmente usados no tratamento da hipertensão humana, também reduzem hipertensão causada por inibição da NOS em ratas grávidas. O mecanismo molecular envolvido na ação anti-

hipertensiva do GSE em ratas grávidas tratadas com um inibidor da NOS ainda não está estabelecido. O significativo efeito vasodilatador, em vasos isolados, observado com o GSE (Soares de Moura *et al.*, 2002), pode explicar um possível aumento no fluxo sanguíneo ao nível da circulação útero-placentária. Em vasos isolados, como mostrado previamente, o efeito vasodilatador do GSE é dependente de NO e também de EDHF, já que o efeito vasodilatador do GSE é reduzido não somente pelo L-NAME e/ou ODQ, um inibidor da guanilato ciclase, mas também por inibidor de SK_{Ca}. A ação protetora do GSE na hipertensão induzida pelo L-NAME em ratas grávidas pode ser devida não somente a um aumento da liberação de NO, mas também a um efeito vasodilatador mediado por EDHF liberado por células endoteliais. Além disso, o efeito anti-oxidante do GSE (Soares de Moura *et al.*, 2002) pode desempenhar um importante papel no efeito protetor dos fetos, visto que Tanir *et al.* (2005), mostrou que compostos anti-oxidantes, reduzem significativamente a alta mortalidade de fetos observada na pré-eclâmpsia experimental, uma condição que apresenta um desequilíbrio entre pró-oxidantes e anti-oxidantes (Roberts *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 1994; Loverro *et al.*, 1996).

A inibição da NOS pelo L-NAME durante a gravidez induz uma significativa redução no número de fetos vivos no final da gravidez, fato já demonstrado anteriormente com ratas tratadas com inibidores da NOS (Yallampalli *et al.*, 1993; Wight *et al.*, 1998; Tanir *et al.*, 2005; Edwards *et al.*, 1996; Witlin *et al.*, 2002). A significativa redução do número de fetos vivos induzida pelo tratamento com L-NAME foi completamente revertida quando o GSE foi administrado, mostrando os efeitos benéficos nos fetos em ratas tratadas com L-NAME. O GSE não apenas reduziu a hipertensão induzida pela inibição da NOS em ratas grávidas, como também diminuiu os efeitos deletérios nos fetos, resultado este, similar ao encontrado por Gairard *et al.* (2004) com a moxonidina. Como o GSE tem uma significativa ação anti-hipertensiva em ratos machos tratados cronicamente com L-NAME (Soares de Moura *et al.*, 2002), o efeito protetor do GSE na gravidez é devido à ausência da hipertensão em ratas grávidas tratadas com L-NAME. Além disso, o GSE tem um efeito vasodilatador, o qual pode proteger os fetos do aumento da resistência vascular uterina na pré-eclâmpsia (Harrington *et al.*, 1996). Não houve redução do número de fetos vivos no grupo tratado apenas com GSE, mostrando que o GSE provavelmente não teve efeito tóxico nos fetos.

A glicemia em jejum foi menor nos animais tratados com L-NAME em relação aos animais que não foram tratados com L-NAME, um efeito que está de acordo com achados prévios (Papaccio *et al.*, 1995; Gonzales *et al.*, 1997). A razão insulina/glicose, durante a infusão de glicose foi significativamente elevada nas ratas tratadas com L-NAME quando comparadas com as ratas controle, sugerindo que a inibição da NOS na gravidez induz à resistência insulínica. A resistência insulínica ocorre na pré-eclâmpsia (Kaaaja *et al.*, 1999; Solomon *et al.*, 2001) e nos ratos tratados com inibidores da NOS, como confirmado previamente (Gairard *et al.*, 2004; Baron *et al.*, 1995; Erlich *et al.*, 1998). O mecanismo da resistência insulínica na pré-eclâmpsia não é conhecido, embora em ratos tratados com inibidores da NOS possa ser devido a redução da formação de NO e conseqüente redução da translocação do GLUT 4 (Roberts *et al.*, 1997) ou diminuição do transporte basal de glicose (Balon *et al.*, 1997). A insulinemia e a razão insulina/glicose durante a infusão de glicose em ratas grávidas tratadas com L-NAME mais GSE foram significativamente menores que nas ratas grávidas tratadas somente com L-NAME, sugerindo que a resistência insulínica induzida pelo L-NAME foi significativamente reduzida pelo GSE.

Polifenóis achados no GSE participam no efeito protetor do extrato na resistência insulínica em ratos com dieta rica em frutose (Al-Awwadi *et al.*, 2005). O consumo de vinho tinto por duas semanas atenuou a resistência insulínica em pacientes diabéticos tipo 2 (Napoli *et al.*, 2005), resultado este que está de acordo com nossos achados na resistência insulínica das ratas tratadas com L-NAME. A moxonidina melhorou a tolerância a glicose em ratas grávidas tratadas com L-NNA, um inibidor da NOS, como mostrado por Gairard *et al.* (2004).

O mecanismo protetor do GSE na resistência insulínica nas ratas tratadas com L-NAME ainda não está esclarecido. A resistência à insulina da obesidade e do diabetes do tipo 2 é caracterizada por alterações em diversos pontos, com redução da concentração e da atividade quinase do receptor, da concentração e da fosforilação do IRS-1 e -2, da atividade da PI 3-quinase, da translocação dos transportadores de glicose e da atividade das enzimas intracelulares (Pessin *et al.*, 2000). É fato que na resistência insulínica há uma redução na atividade da via da PI 3-quinase/Akt que tem importante participação na função metabólica da insulina, mas não da via da MAP kinase que é responsável pelos efeitos de proliferação e diferenciação da insulina. Estudos preliminares do nosso laboratório demonstraram que o GSE ativa a

via PI 3-quinase/Akt em células endoteliais. Desta forma, se o mesmo acontecer no músculo esquelético, adipócitos e/ou no fígado, poderíamos associar este fenômeno à diminuição da resistência insulínica, em ratas grávidas tratadas com L-NAME, promovida pelo GSE.

6 - CONCLUSÃO

Considerando que o GSE, extrato que apresenta atividade anti-oxidante, vasodilatadora e anti-hipertensiva, quando aplicado em ratas grávidas tratadas com L-NAME impediu o desenvolvimento de hipertensão arterial, aumentou o número de fetos vivos e inibiu a resistência à insulina, podemos concluir que este extrato poderá ser mais uma arma terapêutica no tratamento preventivo e mesmo sintomático da pré-eclâmpsia.

7 – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Abel ED, Peroni O, Kim JK, et al. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*. 2001;409:729-33.

Adeagbo AS, Malik KU. Mechanism of vascular actions of prostacyclin in the rat isolated perfused mesenteric arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990 Jan;252(1):26-34.

Alan R. Saltiel & C. Ronald Kahn. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):799-806.

Al-Awwadi N, Araiz C, Bornet A, Delbosc S, Cristol JP, Linck N, et al. Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NAPHD oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension, and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats. *J Agric Food Chem* 2005; 53(1):151-157.

Alessi DR, James SR, Downes CP, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*. 1997;7:261-9.

Andersen MR, Walker LR, Stender S. Reduced endothelial nitric oxide synthase activity and concentration in fetal umbilical veins from maternal cigarette smokers. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Jul;191(1):346-51.

Araki E, Lipes MA, Patti ME, et al. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*. 1994;372:186-90.

August P, Lindheimer MD. Pathophysiology of preeclampsia., in *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, 2nd ed., J.H. Larah and B. M. Brenner, eds., Raven Press Ltd., New York, pp2407-2426, 1995.

Balon TW, Nadler JL. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1997; 82:359-363.

Bandyopadhyay G, Standaert ML, Zhao L, et al. Activation of protein kinase C (alpha, beta, and zeta) by insulin in 3T3/L1 cells. Transfection studies suggest a role for PKC-zeta in glucose transport. *J Biol Chem.* 1997;272:2551-8.

Baron AD, Zhu J-S, Marshal S, Irsula O, Brechtel G, Keech C. Insulin resistance after hypertension induced by the nitric oxide synthesis inhibitor L-NMMA in rats. *Am J Physiol* 1995; 269:E709-715.

Barton M, Cosentino F, Brandes RP, Moreau P, Shaw S, Luscher TF. Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin. *Hypertension.* 1997 Oct;30(4):817-24.

Baylis C, Engels K. Adverse interactions between pregnancy and a new model of systemic hypertension produced by chronic blockade of endothelial derived relaxing factor (EDRF) in the rat. *Clin Exp Hypertens Pregnancy* 1992; B11:117-129

Beazley D, Ahokas R, Livingston J, Griggs M, Sibai BM. Vitamin C and E supplementation in women at high risk for preeclampsia: a double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Obstet Gynecol.* 2005 Feb;192(2):520-1.

Beny JL, von der Weid PY. Hydrogen peroxide: an endogenous smooth muscle cell hyperpolarizing factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Apr 15;176(1):378-84.

Bolton TB, Lang RJ, Takewaki T. Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J Physiol.* 1984 Jun;351:549-72.

Borda ES, Sterin-Borda L, Gimeno MF, Lazzari MA, Gimeno AL. The stimulatory effect of prostacyclin (PGI₂) on isolated rabbit and rat aorta is probably associated to the generation of a thromboxane A₂ (TXA₂) "like-material". *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1983 Jan;261(1):79-89.

Brayden JE. Membrane hyperpolarization is a mechanism of endothelium-dependent cerebral vasodilation. *Am J Physiol*. 1990 Sep;259(3 Pt 2):H668-73.

Brasil. Ministério da Saúde. Datasus. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br>>. Acessado em: 25 out. 2006.

Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*. 2000;289:2122-5.

Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, et al (1998) A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol.Cell*. 1998;2:559-69.

Bruning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell*. 1997;88:561-72.

Bucher HC, Guyatt GH, Cook RJ. Effect of calcium supplementation on pregnancy-induced hypertension and preeclampsia: a meta-analysis of randomised controlled trials. *JAMA* 1996; 275:1113-1117.

Buhimschi IA, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. *Hum Reprod update*. 1998; 4:25-42.

Chappell LC, Seed PT, Briley AL, Kelly FJ, Lee R, Hunt BJ, Parmar K, Bewley SJ, Shennan AH, Steer PJ, Poston L. Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial. *Lancet*. 1999 Sep 4;354(9181):810-6.

Chen D, Mauvais-Jarvis F, Bluher M, et al. p50alpha/p55alpha phosphoinositide 3-kinase knockout mice exhibit enhanced insulin sensitivity. *Mol Cell Biol*. 2004;24:320-9.

Chen G, Cheung DW. Effect of K(+)-channel blockers on ACh-induced hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries. *Am J Physiol.* 1997 May;272(5 Pt 2):H2306-12.

CLASP: a randomised trial of low-dose aspirin for the prevention and treatment of pre-eclampsia among 9364 pregnant women. *Lancet* 1994; 343:619-629.

Collins R, Yusuf S, Peto R. Overview of randomised trials of diuretics in pregnancy. *BMJ* 1985; 290:17-23.

Connors N, Merrill D. Antioxidants for prevention of preterm delivery. *Clin Obstet Gynecol.* 2004 Dec;47(4):822-32; discussion 881-2.

Conrad KF, Joffe GM, Kruszyna H, Kruszyna R, Rochelle LG, Smith RP, et al. Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB J* 1993; 7:566-571 .

Coomarasamy A, Braunholtz D, Song F, Taylor R, Khan KS. Individualising use of aspirin to prevent pre-eclampsia: a framework for clinical decision making. *BJOG.* 2003 Oct;110(10):882-8.

Corriu C, Feletou M, Canet E, Vanhoutte PM. Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol.*; 119(5):959-64, Nov. 1996a.

Corriu C, Feletou M, Canet E, Vanhoutte PM. Inhibitors of the cytochrome P450-mono-oxygenase and endothelium-dependent hyperpolarizations in the guinea-pig isolated carotid artery. *Br J Pharmacol.*; 117(4):607-10, Feb. 1996b.

Cowan CL, Palacino JJ, Najibi S, Cohen RA. Potassium channel-mediated relaxation to acetylcholine in rabbit arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993 Sep;266(3):1482-9.

Cusi K, Maezono K, Osman A, et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest.* 2000;105:311-20.

Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem.* 1999;274:1865-8.

Dong H, Waldron GJ, Galipeau D, Cole WC, Triggle CR. NO/PGI₂-independent vasorelaxation and the cytochrome P450 pathway in rabbit carotid artery. *Br J Pharmacol.* 1997 Feb;120(4):695-701.

Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, et al. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signaling. *Cell.* 1985;40:747-58.

ECCPA: randomised trial of low-dose aspirin for the prevention of maternal and fetal complications in high risk pregnant women. *Br J Obstet Gynecol* 1996; 103:39-47.

Eckman DM, Hopkins N, McBride C, Keef KD. Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in guinea-pig coronary artery: role of epoxyeicosatrienoic acid. *Br J Pharmacol.* 1998 May;124(1):181-9.

Edwards DL, Arora CP, Bui DT, Castro LC. Long-term nitric oxide blockade in the pregnant rat: effects on blood pressure and plasma levels of endothelin-1. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175:484-488.

Einarsson JI, Sangi-Haghpeykar H, Gardner MO. Sperm exposure and development of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2003 May;188(5):1241-3.

Erlich Y, Rosenthal T. Chronic hypertension leads to hyperinsulinemia in Sprague-Dawley rats treated with nitric oxide synthase inhibitor *Am J Hypertens* 1998; 11:1129-1133.

Fayyad AM, Harrington KF. Prediction and prevention of preeclampsia and IUGR. *Early Hum Dev.* 2005 Nov;81(11):865-76. Epub 2005 Nov 11.

Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1988 Mar;93(3):515-24.

Fickling SA, Willian D, Vallance P, Nussey SS, Whitley GS. Plasma concentration of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Lancet* 1993; 342:242-243.

Folli F, Saad MJ, Backer JM, Kahn CR. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. *J Biol Chem.* 1992;267:22171-7.

Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.* 1994 Jun;23(6 Pt 2):1121-31.

Friedman DF. Pathophysiology of preeclampsia. *Clin. Perinatol.* 18(4):661-682,1991.

Frota Madeira SV, Castro Resende A, Ognibene DT, Sousa MAV & Soares de Moura. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilator effect of alcohol free extract obtained from a vinifera grape skin. *Pharmacol Res* 2005; 2:321-327.

Fruman DA, Mauvais-Jarvis F, Pollard DA, et al. Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha. *Nat Genet.* 2000;26:379-82.

Furchgott RF, Jothianandan D. Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels.* 1991;28(1-3):52-61.

Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 1989 Jul;3(9):2007-18.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980 Nov 27;288(5789):373-6.

Gairard A, Lopez-Miranda V, Pernot F, Beck JF, Coumaros G, Overloop BV, La Roche B, Koehl C, Christien MO. Effect of I1 imidazoline receptor agonist, moxonidine, in nitric oxide-deficient hypertension in pregnant rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43:731-736.

Gant NF, Daley GL, Chand S, Whalley PJ. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J Clin Invest.* 1973; 52:2682-2689.

Garcia-Pascual A, Labadia A, Jimenez E, Costa G. Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in bovine oviductal arteries: mediation by nitric oxide and changes in apamin-sensitive K⁺ conductance. *Br J Pharmacol.* 1995 Aug;115(7):1221-30.

Germain AM, Valdes G, Romanik MC, Reyes MS. Evidence Supporting a Beneficial Role for Long-Term L-Arginine Supplementation in High-Risk Pregnancies. *Hypertension.* 2004 Jul;44(1):e1.

Gonzales E, Rosello-Catafau J, Xaus J, Jawerbaum A, Novaro V, Gomes G, Gelpi, Gimeno MA. Influence of nitric oxide synthase and kinin antagonists on metabolic parameters in chronic streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Prostaglandins.* 1997; 53:321-336.

Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 1986 Apr 3-9;320(6061):454-6.

Harrington K, Cooper D, Lees C, Hecher K, Campbell S. Doppler ultrasound of the uterine arteries: the importance of bilateral notching in the prediction of pre-eclampsia, placental abruption or delivery of a small-for-gestational-age baby. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1996; 7:182-188.

Hayman R. Hypertension in pregnancy. *Curr Obstet Gynaecol* 2004; 14: 1-10.

Holden DP, Fickling SA, Whitley GS, Nussey SS. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1998; 178:551-556.

Hongo K, Nakagomi T, Kassell NF, Sasaki T, Lehman M, Vollmer DG, Tsukahara T, Ogawa H, Torner J. Effects of aging and hypertension on endothelium-dependent vascular relaxation in rat carotid artery. *Stroke.* 1988 Jul;19(7):892-7.

Jiang ZY, Lin YW, Clemont A, et al. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J Clin Invest.* 1999;104:447-57.

Kaaja R, Laivuori H, Laakso M, Tikkanen MJ, Ylikorkala O. Evidence of a state of increased insulin resistance in preeclampsia. *Metabolism.* 1999; 48:892-896.

Kahn CR, Flier JS, Bar RS, et al. The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans. Insulin-receptor disorders in man. *N Engl J Med.* 1976;294:739-45.

Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, DePinho R, Charron MJ. Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature.* 1995;377:151-5.

Kessler A, Uphues I, Ouwens DM, Till M, Eckel J. Diversification of cardiac insulin signaling involves the p85 alpha/beta subunits of phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;280:E65-E74.

Kido Y, Burks DJ, Withers D, et al. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest.* 2000;105:199-205.

Kim YB, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 1999;104:733-41.

Kitamura T, Ogawa W, Sakaue H, et al. Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. *Mol Cell Biol.* 1998;18:3708-17.

Koga T, Takata Y, Kobayashi K, Takishita S, Yamashita Y, Fujishima M. Age and hypertension promote endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension.* 1989 Nov;14(5):542-8.

Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem.* 1996;271:31372-8.

Komori K, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Blood Vessels.* 1990;27(2-5):238-45.

Kotani K, Ogawa W, Matsumoto M, et al. Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol.* 1998;18:6971-82.

Kulkarni RN, Winnay JN, Daniels M, et al. Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines. *J Clin. Invest.* 1999;104:R69-R75.

Lazar DF, Wiese RJ, Brady MJ, et al. Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin. *J Biol Chem.* 1995;270:20801-7.

Lietzke SE, Bose S, Cronin T, et al. Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol Cell.* 2000;6:385-94.

Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol.* 2000 Feb;190(3):244-54.

Li H, Wallerath T, Forstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide.* 2002 Sep;7(2):132-47.

Loverro G, Greco P, Capuano F, Carone D, Cormio G, Selvaggi L. Lipoperoxidation and antioxidant enzymes activity in pregnancy complicated with hypertension. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1996; 27; 70(2):123-127.

Magness RR, Rosenfeld CR. Calcium modulation of endothelium-derived prostacyclin production in ovine pregnancy. *Endocrinology.* 1991; 132:113-121.

Mancia G, Ferrari A, Gregorini L. Blood pressure and heart rate variabilities in normotensive and hypertensive human beings. *Clin. Res.* 1983;53:96-104.

Mattivi, F., Zulian, C., Nicolini, G., Valenti, L. Wine, biodiversity, technology, and antioxidants, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.957, p.37-56, mai. 2002.

Mauvais-Jarvis F, Kulkarni RN, Kahn CR. Knockout models are useful tools to dissect the pathophysiology and genetics of insulin resistance. *Clin Endocrinol.* 2002;57:1-9.

Mauvais-Jarvis F, Ueki K, Fruman DA, et al. Reduced expression of the murine p85 α subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes. *J Clin Invest.* 2002;109:141-9.

Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell*. 2000;6:87-97.

Molnár M, Hertelendy F. N ω -Nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis, increases blood pressure in rats and reverses the pregnancy-induced refractoriness to vasopressor agents. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 165:1560-1967.

Molnar M, Suto T, Tóth T, Hertelendy F. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 1994, 170:14.

Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol*. 1999 Jan;31(1):61-74.

Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. *Trends Pharmacol Sci*. 1997 Jul;18(7):252-6.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991 Jun;43(2):109-42.

Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacol Rev*. 1978 Sep;30(3):293-331.

Moura AS, Franco de Sa CC, Lopez da Costa C, Vicente LL, Guerreiro SM, Pinto AM. Association between nutrition and gender during lactation influencing glucose homeostasis and blood pressure of the adult offspring. *Biol Neonate*. 2002.

Murphy ME, Brayden JE. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J Physiol*. 1;486 (Pt 1):47-58, Jul 1995a.

Murphy ME, Brayden JE. Apamin-sensitive K⁺ channels mediate an endothelium-dependent hyperpolarization in rabbit mesenteric arteries. *J Physiol.* 15;489 (Pt 3):723-34, Dec. 1995b.

Nagão T, Illiano S, Vanhoutte PM. Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *Am J Physiol.* 1992 Oct;263(4 Pt 2):H1090-4.

Nakashima M, Mombouli JV, Taylor AA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. *J Clin Invest.* 1993 Dec;92(6):2867-71.

Napoli R, Cozzolino D, Guardasole V, Angelini V, Zarra E, Matarazzo M, et al. Red wine consumption improves insulin resistance but not endothelial function in type 2 diabetic patients. *Metabolism Clinical and Experimental* 2005; 54:30.

Ogg S, Ruvkun G. The *C. elegans* PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway. *Mol Cell.* 1998;2:887-93.

Olanrewaju HA, Hargittai PT, Lieberman EA, Mustafa SJ. Role of endothelium in hyperpolarization of coronary smooth muscle by adenosine and its analogues. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995 Feb;25(2):234-9.

Paez-Espinosa EV, Rocha EM, Velloso LA, Boschero AC, Saad MJ. Insulin-induced tyrosine phosphorylation of Shc in liver, muscle and adipose tissue of insulin resistant rats. *Mol Cell Endocrinol.* 1999;156:121-9.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988 Jun 16;333(6174):664-6.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987 Jun 11-17;327(6122):524-6.

Papaccio G, Esposito V, Latronico MV, Pisanti FA. Administration of a nitric oxide synthase inhibitor does not suppress low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Int J Pancreatol* 1995; 17:63-68.

Parsaee H, McEwan JR, Joseph S, MacDermot J. Differential sensitivities of the prostacyclin and nitric oxide biosynthetic pathways to cytosolic calcium in bovine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 1992 Dec;107(4):1013-9.

Pascoal IF. Pré-Eclâmpsia: Mecanismos Fisiopatológicos e suas Implicações Terapêuticas. *Revista Virtual de Medicina.* v.1- n.1- ano1 (Jan/Fev/Mar de 1998)

Pascoal IF, Lindheimer MD, Nalbantian-Brandt C, Umans JG. Preeclampsia selectively impairs endothelium-dependent relaxation and leads to oscillatory activity in small omental arteries. *J Clin Invest* January 15, 1998;101(2):

Pascoal IF, Mion Jr D, Sabbaga, E. Nefropatia e Hipertensão na Gravidez. In *Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólitos*, 3ª Edição: M. C. Riella (Ed), Guanabara Koogan, p382-390,1996.

Pascoal IF, Umans JGU. Effects of pregnancy on mechanisms of relaxation in human omentum microvessels. *Hypertension* 1996;28:183-7.

Patti ME, Kahn CR. The insulin receptor — a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1998;9:89-109.

Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000;106:165-9.

Pettersson A, Hedner T, Milsom I. Increased circulating concentrations of asymmetric dimethyl arginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 77:808-813.

Plane F, Garland CJ. Influence of contractile agonists on the mechanism of endothelium-dependent relaxation in rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 1996 Sep;119(2):191-3.

Podjarny E, Benchetrit S, Katz B, Green J, Bernhein J. Effect of methyldopa on renal function in rats with L-name-induced hypertension in pregnancy. *Nephron* 2001; 88:354-359.

Price, S.F., Breen, P.J., Valladao, M., and Watson, B.T. Cluster sun-exposure and quercetin in Pinot Noir grapes and wine. *Am. J Enol. Vitic.*, v.46, n.2, p. 187-94, 1995.

Randall MD, Alexander SP, Bennett T, Boyd EA, Fry JR, Gardiner SM, Kemp PA, McCulloch AI, Kendall DA. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Dec 4;229(1):114-20.

Ray JG, Vermeulen MJ, Schull MJ, Redelmeier DA. Cardiovascular health after maternal placental syndromes (CHAMPS): population-based retrospective cohort study. *Lancet.* 2005 Nov 19;366(9499):1797-803.

Rezende Filho J, Castro P, Leite SP, Montenegro CAB, Lima ML. Preeclampsia: na overview in placentation, endothelial dysfunction and flow-mediated vasodilatation. *Utras Rev Obstet Gynecol* 2005; 5:242-53.

Rezende Filho J. *Toxemia Gravídica: Uma Doença em Dois Estágios - Monografia* – 2006.

Richard J. Levine, John C. Haut, Luis B. Curet, Baha M. Sibai, Patrick M. Catalano, Cynthia D. Morris, Rebecca DerSimonian, Joy R. Esterlitz, Elizabeth G. Raymond, Diane E. Bild, John D. Clements, Jeffrey A. Cutler. Trial of calcium to prevent preeclampsia. *N Engl J Med* 1997; 337:69-76.

Roberts CK, Barnard RJ, Scheck SH, Balon TW. Exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle is nitric oxide dependent. *Am J Physiol* 1997; 273:E220-225.

Roberts JM, D'Abarro J. Effects of calcium supplementation on pregnancy-induced hypertension. *JAMA* 1996; 276:1386-1387.

Roberts JM, Hubel CA. Oxidative stress in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190:1177-1178.

Rodie VA, Freeman DJ, Sattar N, Greer IA. Pre-eclampsia and cardiovascular disease: metabolic syndrome of pregnancy? *Atherosclerosis* 2004; 175:189-202.

Saad MJ, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, Kahn CR. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest*. 1992;90:1839-49.

Saad MJ, Folli F, Kahn JA, Kahn CR. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *J Clin Invest*. 1993;92:2065-72.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865): 799-806.

Schiessl B, Strasburger C, Bidlingmaier M, Mylonas I, Jeschke U, Kainer F, Friese K. Plasma- and urine concentrations of nitrite/nitrate and cyclic guanosinemonophosphate in intrauterine growth restricted and preeclamptic pregnancy. *Arch Gynecol Obstet*. 2006 Jun;274(3):150-4. Epub 2006 Mar 11.

Schnyder G, Roffi M, Flammer Y, Pin R, Hess OM. Effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid, vitamin B12, and vitamin B6 on clinical outcome after percutaneous coronary intervention: the Swiss Heart study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2002 Aug 28;288(8):973-9.

Schobel HP, Fisher T, Heuszer K, Geiger H, Schmieder RE. Preeclampsia: a state of sympathetic overactivity. *N Engl. J Med* 1996; 335:1480-1485.

Shepherd PR, Nave BT, Siddle K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem J.* 1995;305:25-8.

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965; 16:144-158.

Soares de Moura R, Costa Vieira FS, Souza MAV, Kovary K, Guedes DC, Oliveira E P B, et al. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of vinifera grape-skin extract. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54:1515-1520.

Soares de Moura, R. Efeito cardioprotetor do vinho. *Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica*, v.1, mai. 2003.

Solomon CG, Seely EW. Brief review: Hypertension in pregnancy: a manifestation of the insulin resistance syndrome? *Hypertension* 2001; 37:232-239.

Stern MP. Strategies and prospects for finding insulin resistance genes. *J Clin Invest.* 2000;106:323-7.

Taddei S, Ghiadoni L, Viridis A, Versari D, Salvetti A. Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies. *Curr Pharm Des.* 2003;9(29):2385-402.

Taddei S, Viridis A, Mattei P, Ghiadoni L, Gennari A, Fasolo CB, Sudano I, Salvetti A. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation.* 1995 Apr 1;91(7):1981-7.

Tare M, Parkington HC, Coleman HA, Neild TO, Dusting GJ. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. *Nature*. 1990 Jul 5;346(6279):69-71.

Tanir HM, Sener T, Inal M, Fahrettin A, Uzuner K, Sivri E. Effect of quercetine and glutathione on the level of superoxide dismutase, catalase, malonyldialdehyde, blood pressure and neonatal outcome in a rat model of pre-eclampsia induced by NG-nitro-L-arginine-methyl ester. *Eur J Obst Gynecol* 2005; 118:190-195.

Taylor SI, Kadowaki T, Accili D, et al. Mutations in the insulin receptor gene in genetic forms of insulin resistance. *Recent Prog Horm Res*. 1990;46:185-213.

Terauchi Y, Iwamoto K, Tamemoto H, et al. Development of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the double knockout mice with disruption of insulin receptor substrate-1 and beta cell glucokinase genes. Genetic reconstitution of diabetes as a polygenic disease. *J Clin Invest*. 1997;99:861-6.

Terauchi Y, Tsuji Y, Satoh S, et al. Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat Genet*. 1999;21:230-5.

Triggle CR, Dong H, Waldron GJ, Cole WC. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): species and tissue heterogeneity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999 Feb;26(2):176-9.

Trupin LS, Simon LP, Eskenazi B. Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas. *Epidemiology*. 1996 May;7(3):240-4.

Umans JG, Liendheimer MD, Barron WM. Pressor effect of endothelium-derived relaxing factor inhibition in conscious virgin and gravid rats. *Am J Physiol* 1990; 259:F293-296.

Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*. 1990 Jul 5;323(1):27-36.

Vane JR. The Croonian Lecture, 1993. The endothelium: maestro of the blood circulation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1994 Jan 29;343(1304):225-46.

Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension.* 1989 Jun;13(6 Pt 2):658-67.

Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1997 Nov;90 Spec No 6:9-19.

Vanhoutte PM, Boulanger CM, Mombouli JV. Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibition. *Am J Cardiol.* 1995 Nov 24;76(15):3E-12E.

Vanhoutte PM, Mombouli JV. Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Prog Cardiovasc Dis.* 1996 Nov-Dec;39(3):229-38.

Wacker J, Fruhauf J, Schulz M, Chiwora FM, Volz J, Becker K. Riboflavin deficiency and preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2000 Jul;96(1):38-44.

Waldron GJ, Cole WC. Activation of vascular smooth muscle K⁺ channels by endothelium-derived relaxing factors. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999 Feb;26(2):180-4.

Walsh SC. Lipid peroxidation in pregnancy. *Hypertension Preg* 1994; 13:1-25.

Walsh SW. Preeclampsia: an imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 152:335-340.

Waterhouse, A.L. Wine phenolics. *Ann N. Y. Acad. Sci.* V.957, p.21-36, mai. 2002.

Weiner CP, Kwann HC, Xu C, Paul M, Burmesiter L, Hauck W. Antitrombine III activity in women with hypertension during pregnancy. *Obstet Gynecol* 65:301-305,1985.

White MF, Haring HU, Kasuga M, Kahn CR. Kinetic properties and sites of autophosphorylation of the partially purified insulin receptor from hepatoma cells. *J Biol Chem.* 1984;259:255-64.

White MF, Shoelson SE, Keutmann H, Kahn CR. A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J Biol Chem.* 1988;263:2969-80.

White MF. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem.* 1998;182:3-11.

Wight E, Kng CF, Moreau P, Takase H, Lscher TF. Chronic blockade of nitric oxide-synthase and andothelin receptors during pregnancy in the rat: effect of pregnancy outcome. *J Soc Gynecol Invest* 1998; 5:132-139.

Witlin AG, Gangula PRR, Thmpson ML, Yallamall C. Growth and fertility rates in the offspring of pregnant rats treated with L ω nitro L arginine methyl ester (L NAME), a nitric oxide inhibitor. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186(1):89-93.

Yallampalli C, Garfield RE. Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169:1316-1320.

Zecchin HG, Bezerra RM, Carvalheira JB, et al. Insulin signaling pathways in aorta and muscle from two animal models of insulin resistance — the obese middle-aged and the spontaneously hypertensive rats. *Diabetologia.* 2003;46:479-91.

Zecchin HG, Carvalheira JBC, Saad MJA. Mecanismos Moleculares de Resistência à Insulina na Síndrome Metabólica. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2004;4:574-89.

Zygmunt PM, Hogestatt ED. Role of potassium channels in endothelium-dependent relaxation resistant to nitroarginine in the rat hepatic artery. *Br J Pharmacol.* 1996 Apr;117(7):1600-6.

Zygmunt PM, Edwards G, Weston AH, Larsson B, Hogestatt ED. Involvement of voltage-dependent potassium channels in the EDHF-mediated relaxation of rat hepatic artery. *Br J Pharmacol.* 1997 May;121(1):141-9.

Zisman A, Peroni OD, Abel ED, et al. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med.* 2000;6:924-8.

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](#)