

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEFROLOGIA

TESE DE DOUTORADO

Aspectos da fisiopatologia da pré-eclâmpsia:

Efeito da N-iminoetil-L-ornitina nas Alterações Hemodinâmicas Renais  
durante a Gestação e o Papel da Interleucina 6 na Hipertensão Produzida por  
Redução na Perfusão Uterina em Ratas Prenhes

GIOVANI GADONSKI

Tese de Doutorado sob orientação:

Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo

Dr. Joey P. Granger

Porto Alegre, RS, Brasil

DEZEMBRO DE 2006

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEFROLOGIA

TESE DE DOUTORADO

Aspectos da fisiopatologia da pré-eclâmpsia:

Efeito da N-iminoetil-L-ornitina nas Alterações Hemodinâmicas Renais  
durante a Gestação e o Papel da Interleucina 6 na Hipertensão Produzida por  
Redução na Perfusão Uterina em Ratas Prenhes

GIOVANI GADONSKI

Porto Alegre, RS, Brasil

DEZEMBRO DE 2006

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

G125a Gadonski, Giovanni

Aspectos da fisiopatologia da pré-eclâmpsia: efeito da N-iminoetil-L-ornitina nas alterações hemodinâmicas renais durante a gestação e o papel da interleucina 6 na hipertensão produzida por redução na perfusão uterina em ratas prenhes / orient. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo e Joey P. Granger. Porto Alegre: PUCRS, 2006.

149f.: graf. il. tab.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Nefrologia.

1. HIPERTENSÃO INDUZIDA PELA GRAVIDEZ. 2. PRÉ-ECLÂMPSIA/fisiopatologia. 3. ÓXIDO NÍTRICO SINTASE. 4. HIPERTENSÃO RENAL. 5. PROCESSOS HEMODINÂMICOS. 6. INTERLEUCINA-6. 7. RATOS 9. PRENHEZ. 10. ÓXIDO NÍTRICO 11. MODELOS ANIMAIS. I. Figueiredo, Carlos Eduardo Poli de. II. Granger, Joey P. III. Título

C.D.D. 618.75

C.D.U. 618.3-008.6:599.323.4(043.2)

N.L.M. WQ 215

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia  
Bibliotecária CRB 10/196

## FONTES FINANCIADORAS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

University of Mississippi Medical Center (UMC)

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Este trabalho foi desenvolvido na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas, no Ambulatório de Hipertensão Gestacional vinculado ao Serviço de Nefrologia do Hospital São Lucas da PUC-RS e no Laboratório do Dr. Joey P. Granger - Departamento de Fisiologia e Biofísica da University of Mississippi Medical Center.

## DEDICATÓRIA

A todas as instituições de ensino por onde passei, desde o ensino fundamental até o doutorado. A todos os professores, tão pouco valorizados em nosso país e tão importantes em nossas vidas.

Aos meus pais, Apolinário e Elíria, pelo amor que não espera retorno, pelo apoio incondicional, pela confiança nas horas decisivas e pela cobrança pertinente.

À Helena, por ter comprado a idéia, apostado e conseguido fazer com que eu me sinta uma pessoa melhor a cada dia que vivemos. Em minha vida, “she is the one”.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo que, desde a minha entrevista para a residência médica, abriu portas, proporcionou oportunidades, incentivou o estudo, acreditou em mim. Pelo teu caráter, honestidade e conduta tu és um exemplo de nefrologista, professor, pesquisador, esposo e pai.

Ao Dr Joey P. Granger e todas as pessoas que conheci em Jackson, Mississippi, por ter oferecido o uso irrestrito de todas as instalações do laboratório de Fisiologia. Aprendi a respeitar os americanos, tantas vezes julgados erroneamente e de maneira generalizada. Comprovei que é o país das oportunidades, frequentemente negadas em nosso meio e que deixa de explorar capacidades imensas encontradas em nosso país.

Aos doutores Domingos O. D'Ávila, Ivan C. Antonello, Alexandre Losekann e Maria Cláudia Irigoyen, que fizeram com que eu me sentisse capaz de investir em projetos hoje realizados anteriormente vistos como sonhos.

Ao Serviço de Nefrologia do Hospital São Lucas – PUCRS e aos colegas do Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas da PUCRS, especialmente a Dra. Bartira E. P. da Costa, sempre disposta a ajudar, sempre dedicada ao laboratório, sempre aberta aos alunos. Aos colegas de pós-graduação e aos alunos de iniciação científica, pelos momentos compartilhados e pela luta constante para realização dos estudos.

À Secretaria do Programa de Pós-graduação pela atenção dispensada, pelo tratamento cordial e educado.

Aos meus irmãos Rejane, Cássio e Giselle que sempre acreditaram em mim, souberam entender os momentos de ausência e apoiaram todas as

minhas decisões, mesmo quando com opiniões contrárias. À minha sogra, Heloísa, aos meus cunhados Maurênio, Alfredo e Nádía pela convivência prazerosa. Ao meu afilhado, Matheus, pela alegria e intensidade em viver.

Aos meus amigos de Frederico Westphalen, de Jackson e da Faculdade de Medicina, que me acolheram com tanto carinho.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURA E SINAIS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xv
RESUMO .....	xvi
ABSTRACT .....	xviii
INTRODUÇÃO .....	20
CONSIDERAÇÕES SOBRE A TESE .....	37
ESTUDO 1 .....	39
ESTUDO 2 .....	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89
ANEXO 1 .....	105

Estudo submetido ao Brazilian Journal of Medical and Biological Research: Effect of L-NIO on renal hemodynamic changes during pregnancy.

ANEXO 2 .....	118
---------------	-----

Estudo publicado no periódico Hypertension: Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of interleukin-6.

ANEXO 3 .....	124
---------------	-----

Estudo Piloto

ANEXO 4 .....	126
---------------	-----

Estudo publicado no periódico BMC Physiology: Exercise increases endostatin in circulation of healthy volunteers.



ANEXO 5 .....	132
Ambulatório de Hipertensão Gestacional	
ANEXO 6 .....	134
Produção Científica	
ANEXO 7 .....	138
Protocolo de Consulta Inicial e de Retorno do Ambulatório de Hipertensão Gestacional	

## LISTA DE ABREVIATURAS E SINAIS

DHG	Doenças hipertensivas gestacionais
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ET	Endotelina
FPR	Fluxo plasmático renal
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCl	Ácido clorídrico
<sup>125</sup> I	Iotalamato
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
L-NIO	N-iminoetil-L-ornitina
mmHg	Milímetros de mercúrio
mRNA	RNA mensageiro
N	Normal
Ng	Nanogramas
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS	Óxido nítrico sintase
° C	Graus Celcius
NO	Óxido nítrico
PA	Pressão arterial
PAH	Ácido pára-aminohipúrico

PAM	Pressão arterial média
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDE	Fosfodiesterase
PE	Pré-eclâmpsia
PIGF	Fator de crescimento placentário
PN	Prenhes normais
RUPP	Redução crônica na pressão de perfusão uterina
RVR	Resistência vascular renal
SE	Erro padrão
sFlt1	Tirosina quinase 1 placentária solúvel tipo fms
TFG	Taxa de filtração glomerular
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UMC	University of Mississippi Medical Center
VCAM	Molécula de adesão vascular celular
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Potenciais mecanismos pelos quais a redução crônica da perfusão útero-placentária pode levar à hipertensão. ON, óxido nítrico; PG2, prostaciclina; ANG II, angiotensina II; RVP, resistência vascular periférica ..... Página 26

Figura 2. Representação esquemática do modelo de redução da pressão de perfusão uterina em ratas prenhes (RUPP) ..... Página 35

Figura 3. Alterações na pressão arterial média (PAM, 3a), taxa de filtração glomerular (TFG, 3b), fluxo plasmático renal (FPR, 3c) e resistência vascular renal (RVR, 3d) em resposta à infusão intravenosa aguda de L-NIO (20 mg/kg) em ratas virgens e prenhes em vigília. Todos os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão (SE). \*  $P < 0,05$  versus controle # versus virgens controles ..... Página 51

Figura 4. Pressão arterial média (PAM) e níveis séricos de IL-6 em ratas prenhes normais (PN) e ratas prenhes submetidas ao modelo RUPP. \*  $P < 0,05$  versus ratas prenhes controles. Todos os dados são expressos em média  $\pm$  SE ..... Página 67

Figura 5. Pressão arterial média e concentração sérica de IL-6 em ratas prenhes controle e prenhes tratadas com IL-6 no dia 19 de gestação. \*  $P < 0,05$  versus ratas prenhes controles. Todos os dados são expressos em média  $\pm$  SE..... Página 69

Figura 6. Taxa de filtração glomerular (TFG) e fluxo plasmático renal (FPR) e resistência vascular renal (RVR) em ratas prenhes controles e prenhes tratadas com IL-6 no décimo nono dia de gestação. \*  $P < 0,05$  versus ratas prenhes controles. Todos os dados são expressos em média  $\pm$  SE..... Página 71

Figura 7. Pressão arterial média e concentração de IL-6 em ratas virgens controle e virgens tratadas com IL-6. \*  $P < 0,05$  versus ratas prenhes controles. Todos os dados são expressos em média  $\pm$  SE..... Página 72

Figura 8. Taxa de filtração glomerular (TFG), fluxo plasmático renal (FPR) e resistência vascular renal (RVR) em ratas virgens controles e virgens tratadas com IL-6. Todos os dados são expressos em média  $\pm$  SE..... Página 74

Figura 9. Níveis plasmáticos de endotelina em ratas prenhes controles e prenhes tratadas com IL-6. Expressão da pré-pró endotelina no tecido renal de ratas prenhes controle e prenhes após infusão de IL-6. Não houve diferença significativa entre os grupos. Todos os dados são expressos como média  $\pm$  SE..... Página 75

Figura 10. Atividade plasmática da renina em ratas prenhes controles e prenhes tratadas com IL-6. \*  $P < 0,05$  versus ratas prenhes controle. Todos os dados são expressos como média  $\pm$  SE..... Página 76

Figura 11. Níveis séricos de IL-6 de acordo com a dose diária administrada..... Página 125

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Infusão de IL-6 e modificações no peso e na ingestão de ração.....	Página 124
--	------------

## RESUMO

O presente trabalho aborda aspectos da fisiopatologia da pré-eclâmpsia (PE) em dois estudos.

A avaliação da participação da isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) no processo de adaptação hemodinâmica renal e sistêmica observadas na gestação foi o objetivo do primeiro estudo. Para isso, foi utilizado o inibidor mais potente da eNOS, N-iminoetil-L-ornitina: L-NIO.

A administração aguda de L-NIO em ratas prenhes diminuiu a taxa de filtração glomerular (TFG) e o fluxo plasmático renal (FPR), bem como aumentou a resistência vascular renal (RVR). Em contraste, L-NIO não apresentou efeitos hemodinâmicos significativos em ratas virgens. Esses achados sugerem que a eNOS possa ter um papel importante como mediador das alterações hemodinâmicas renais ocorridas durante a gestação.

Um dos possíveis mecanismos ligados à gênese da PE ocorre devido à resposta inflamatória intravascular excessiva. O modelo de redução da pressão de perfusão uterina (RUPP) em ratas prenhes está associado ao aumento dos níveis de pressão arterial e proteinúria. O objetivo do segundo estudo foi investigar a participação da interleucina-6 (IL-6) no aumento da pressão arterial (PA) no modelo RUPP. A elevação na pressão arterial em ratas do modelo RUPP está associada ao aumento dos níveis de IL-6. A elevação dos níveis de IL-6 em ratas prenhes, atingindo níveis comparáveis àqueles encontrados em ratas do modelo RUPP, resultou em aumento significativo da PA e da RVR, além de redução do FPR renal e da TFG em relação ao grupo controle. A IL-6 induziu aumento na atividade plasmática da renina, mas não alterou



significativamente os níveis de endotelina nas ratas tratadas com IL-6. A IL-6 não induziu efeitos significativos sobre os parâmetros hemodinâmicos renais em ratas virgens. Esses resultados indicam que os níveis de IL-6 estão aumentados no modelo RUPP e que o aumento dos níveis de IL-6 está associado à elevação da PA e diminuição dos parâmetros hemodinâmicos renais em ratas prenhes.

## ABSTRACT

The present thesis evaluates different aspects of the physiopathology of preeclampsia in two studies.

The role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in renal and systemic hemodynamic changes during pregnancy was the aim of the first experiment. To achieve this goal, N-iminoethyl-L-ornithine (L-NIO), the most potent eNOS inhibitor, was used.

Acute L-NIO infusion in pregnant rats decreased glomerular filtration rate (GFR) and renal plasma flow (RPF), as well as increased renal vascular resistance (RVR). In contrast, L-NIO did not induce significant hemodynamic effects in virgin rats. These findings suggest that eNOS may play a role in mediating renal hemodynamic changes during normal pregnancy.

A possible mechanism of PE is related to excessive intravascular inflammatory response. Chronic reductions in uterine perfusion pressure (RUPP) in pregnant rats are associated with increased arterial pressure (AP) and proteinuria. The purpose of the second study was to determine the role of interleukin-6 (IL-6) in mediating the increase in AP in response to RUPP in pregnant rats. Increased AP in pregnant RUPP rat was associated with increased IL-6 serum levels. Furthermore, chronic elevation in IL-6 serum level in pregnant rats, reaching levels similar to those observed in RUPP rats, was related to significant increment in AP and RVR as well as reduction in RPF and GFR compared to controls. Interleukin-6 increased plasma renin activity but did not change endothelin levels in pregnant rats treated with IL-6. Interleukin-6 had no effect on AP or renal hemodynamics in virgin rats. These data indicate that

plasma IL-6 is elevated in response to chronic reductions in uterine perfusion in pregnant rats and that a comparable elevation in plasma IL-6 increases AP and reduces renal function in pregnant rats.

## INTRODUÇÃO

“Paciente de 22 anos, feminina, negra, primigesta, comparece à emergência obstétrica de hospital terciário apresentando documento de acompanhamento pré-natal realizado no posto de saúde. Nele, se pode verificar que a mesma encontra-se na trigésima semana de gestação. Ela refere fortes dores de cabeça, além de enxergar pontos luminosos. Ao exame físico, verificam-se níveis pressóricos de 180 x 110 milímetros de mercúrio (mmHg) e edema de membros inferiores (3+).

A paciente é internada e o feto monitorizado. São solicitados exames complementares que demonstram proteinúria de dois gramas (g) e níveis séricos de ácido úrico acima do normal. Após 24 horas, sua gestação é interrompida e seu filho nasce em precárias condições respiratórias. O recém-nascido é internado na unidade de terapia intensiva onde, dois dias após, acaba falecendo.”

Esse relato é semelhante àqueles referidos por um número expressivo de mulheres nos mais diversos lugares do mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, dentre as doenças hipertensivas ligadas à gestação, a pré-eclâmpsia (PE) afeta de 2% a 3% de todas as gestações no mundo, sendo responsável por, aproximadamente, 60.000 mortes a cada ano.<sup>1</sup> Em gestantes de baixo risco atendidas no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, a incidência de PE foi de 4,6%.<sup>2</sup> Estudo realizado durante 20 anos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre demonstrou que dentre as causas de morte obstétricas diretas, a principal é a

hipertensão arterial sistêmica (HAS), ocorrendo em 18,5 % dos casos.<sup>3</sup> Devido às diferenças encontradas entre as populações estudadas e os locais onde foram coletados os dados, os números referentes à incidência e à prevalência da doença podem variar amplamente, conforme demonstrado acima.

Recém-nascidos de mães com pré-eclâmpsia têm risco de morte cinco vezes maior quando comparados com filhos de gestantes sem a doença. A principal causa para o aumento do risco reside na prematuridade iatrogênica.<sup>4</sup>

A pré-eclâmpsia é uma síndrome que faz parte de um conjunto de patologias denominadas doenças hipertensivas gestacionais. Elas constituem uma das principais causas de morbidade e de mortalidade tanto materna quanto fetal, mesmo em países desenvolvidos. Essa condição está associada a restrição de crescimento intra-uterino em cerca de 30% dos casos,<sup>5</sup> além de parto prematuro e baixo peso ao nascer.<sup>6</sup>

Segundo o grupo de investigação do “National Heart, Lung and Blood Institute”, as doenças hipertensivas gestacionais podem ser classificadas em pré-eclâmpsia, eclâmpsia, hipertensão gestacional e hipertensão crônica. Define-se pré-eclâmpsia como surgimento de hipertensão arterial sistêmica (pressão arterial sistólica maior ou igual a 140 mmHg ou pressão arterial diastólica igual ou acima de 90 mmHg) combinada com proteinúria superior a 300 miligramas (mg) manifestadas após a vigésima semana de gestação. Eclâmpsia ocorre quando a PE evoluiu acompanhada de crises convulsivas. A hipertensão gestacional surge após a metade da gestação, podendo ser distinguida da PE por não apresentar proteinúria acima de 300 mg. Por outro lado, a hipertensão crônica pode ser caracterizada pela elevação dos níveis tensionais acima dos limites citados, instalada previamente ao período

gestacional, ou antes da vigésima semana de gestação. Considera-se ainda hipertensão crônica quando a pressão arterial permanece elevada após doze semanas do parto.<sup>6</sup>

Estudo de coorte realizado no Brasil entre 1991 e 1995 demonstrou uma incidência de 7,5% de doenças hipertensivas ligadas à gestação. Dentre elas, foi diagnosticado pré-eclâmpsia em 2,3% dos casos. Além disso, 4% das gestantes foram classificadas como hipertensas crônicas.<sup>7</sup>

Conforme referido por Roberts,<sup>8</sup> a descrição do quadro clínico da PE não é recente. Há 2.000 anos, Celsus já havia relatado convulsões em gestantes e observado que as crises desapareciam após o parto. Uma vez que essa condição apresentava início súbito e sem sinais prévios, ela foi denominada eclâmpsia, palavra grega utilizada para designar raio. Durante o século XIX demonstrou-se que o quadro era freqüentemente acompanhado por perda de proteína na urina previamente ao surgimento das convulsões, condição que passou a ser chamada de pré-eclâmpsia. Mais tarde, através de métodos não invasivos, verificou-se a associação desses achados com aumento dos níveis de pressão arterial sistêmica, chegando-se aos elementos que compõem a síndrome de pré-eclâmpsia atualmente.

A PE é uma doença que ocorre mais freqüentemente em primigestas e nos extremos etários das gestantes.<sup>5</sup> É mais comum em filhas de mulheres que apresentaram PE durante suas gestações e em gestantes cujo cônjuge é filho de mãe com PE,<sup>9</sup> o que sugere um envolvimento genético para essa desordem. Também são descritos como fatores de risco para a doença: história prévia de PE, obesidade, história familiar de PE, gestação múltipla e doenças crônicas, tais como trombofilias, hipertensão arterial sistêmica e diabetes

mellitus.<sup>10</sup> Atualmente, a obesidade é considerada um importante risco para PE, sendo diretamente proporcional ao índice de massa corporal. A obesidade apresenta uma forte relação com aumento da resistência periférica à insulina, que também é reconhecido como fator de risco para PE. Infertilidade, especialmente se causada por doença policística ovariana, e aborto espontâneo de repetição também são admitidos como fatores de risco para PE. Avanços tecnológicos na reprodução assistida trouxeram desafios ao sistema imune materno, o que também aumenta o risco de PE. Fatores que induzem aumento na resposta inflamatória materna, tais como infecções e doenças reumatológicas, podem predispor as gestantes à pré-eclâmpsia.<sup>11</sup>

### Fisiopatologia

Um modelo que divide a PE em dois estágios tem sido utilizado conceitualmente, permitindo uma melhor abordagem no entendimento da fisiopatologia da doença. O fato de a PE ser uma doença específica da gestação, desaparecendo após o parto, denota a participação crucial da placenta na sua fisiopatogenia. A redução da perfusão útero-placentária tem sido postulada como o evento inicial, sendo resultado da invasão anormal do citotrofoblasto sobre as arteríolas espiraladas. Esse estágio, de uma maneira ainda não totalmente elucidada, evolui em algumas gestantes para a segunda etapa da doença, que corresponde à síndrome materna da pré-eclâmpsia.<sup>12</sup>

Atualmente, evidências demonstram que a placenta exerce uma participação fundamental no desenvolvimento da pré-eclâmpsia. Essa conclusão foi inicialmente sugerida em um relato de caso de gestação

abdominal acompanhada de PE onde, na ocasião do parto, não foi retirado completamente o tecido placentário. O quadro de PE persistiu até o momento em que toda a placenta foi removida.<sup>13</sup> Ademais, observa-se que não há necessidade da presença do feto, uma vez que está descrito PE em casos de mola hidatiforme, onde virtualmente não existe tecido fetal.<sup>14</sup>

Na gestação normal, as artérias espiraladas do miométrio e da decídua que perfundem a placenta sofrem profundo remodelamento. Esse processo se caracteriza pela desintegração da túnica média e da lâmina elástica interna, além da substituição endotelial por células trofoblásticas extravilosas que expressam o fenótipo endotelial.<sup>15</sup> Ao final do processo, as artérias espiraladas passam a apresentar um diâmetro pelo menos quatro vezes maior que aquele encontrado nas artérias não envolvidas na gestação. Na PE, esses vasos sofrem mínimas modificações.<sup>12</sup>

O controle celular da invasão trofoblástica depende da interação entre a decídua materna e o trofoblasto fetal. A tensão de oxigênio local<sup>16</sup> e a interação com o sistema imunológico<sup>17</sup> são fatores determinantes nesse processo, sendo que o mecanismo final parece estar associado ao aumento da taxa de apoptose dos citotrofblastos que invadem o útero de gestantes com PE.<sup>18</sup> A apoptose leva à liberação de microfragmentos de sinciciotrofblastos na circulação materna. Os microfragmentos se encontram elevados no soro de pacientes com PE, podendo também ter participação no desenvolvimento da doença.<sup>19</sup>

Porém, indubitavelmente, é preciso mais que a presença da placenta para o desenvolvimento da PE, visto que apenas uma parcela das gestantes desenvolve a doença. Múltiplos fatores maternos, tais como carga genética,



ambiente e comportamento, devem interagir com a redução da perfusão placentária para culminar na síndrome completa. Nas pacientes com esses fatores, a redução da perfusão placentária desencadeia alterações sistêmicas que constituem o segundo estágio da doença.

A síndrome materna se caracteriza pela redução da perfusão de outros órgãos, além da placenta. Esse processo pode estar relacionado à ausência da redução da resistência vascular periférica e da reatividade vascular aos agonistas vasoconstritores observados na gestação normal<sup>20</sup>, podendo evoluir acompanhada de hemorragia e necrose. No fígado, a expressão clínica pode ser evidenciada pelo aumento dos níveis séricos das transaminases.<sup>5</sup> Alteração visual e cefaléia persistente traduzem o envolvimento do sistema nervoso central.<sup>21</sup> Nos rins, ocorre diminuição da taxa de filtração glomerular, o que pode ocasionar aumento dos níveis plasmáticos de ácido úrico.<sup>4</sup> No tecido cardíaco, está descrito necrose subendocárdica associada à doença.<sup>22</sup>

Todos esses órgãos têm em comum o envolvimento do endotélio vascular. Através de biópsia renal de gestantes com PE, foi observado endoteliose glomerular, que consiste no aumento das dimensões dos glomérulos devido à hipertrofia das células endoteliais.<sup>23</sup> Esse achado acabou evidenciando a participação do endotélio na doença,<sup>22</sup> sendo posteriormente reforçado pela descrição do aumento dos marcadores de dano endotelial, tais como o fator de Von Willibrand, a fibronectina, a trombomodulina e a endotelina.<sup>8</sup>

O endotélio apresenta múltiplas funções extremamente importantes, destacando-se o controle do tônus da musculatura lisa dos vasos através da liberação de vasoconstritores e vasodilatadores. Esse balanço é fundamental

para determinar a resistência vascular periférica e, conseqüentemente, a pressão arterial.

Uma das propostas para explicar a fisiopatologia da PE está ilustrada na Figura 1. Este modelo proposto por Granger e colaboradores integra os conceitos de baixa perfusão placentária com disfunção endotelial e seus mediadores. O modelo mostra um desequilíbrio nos mediadores vasodilatadores e vasoconstritores, assim como reatividade vascular alterada.<sup>24</sup>

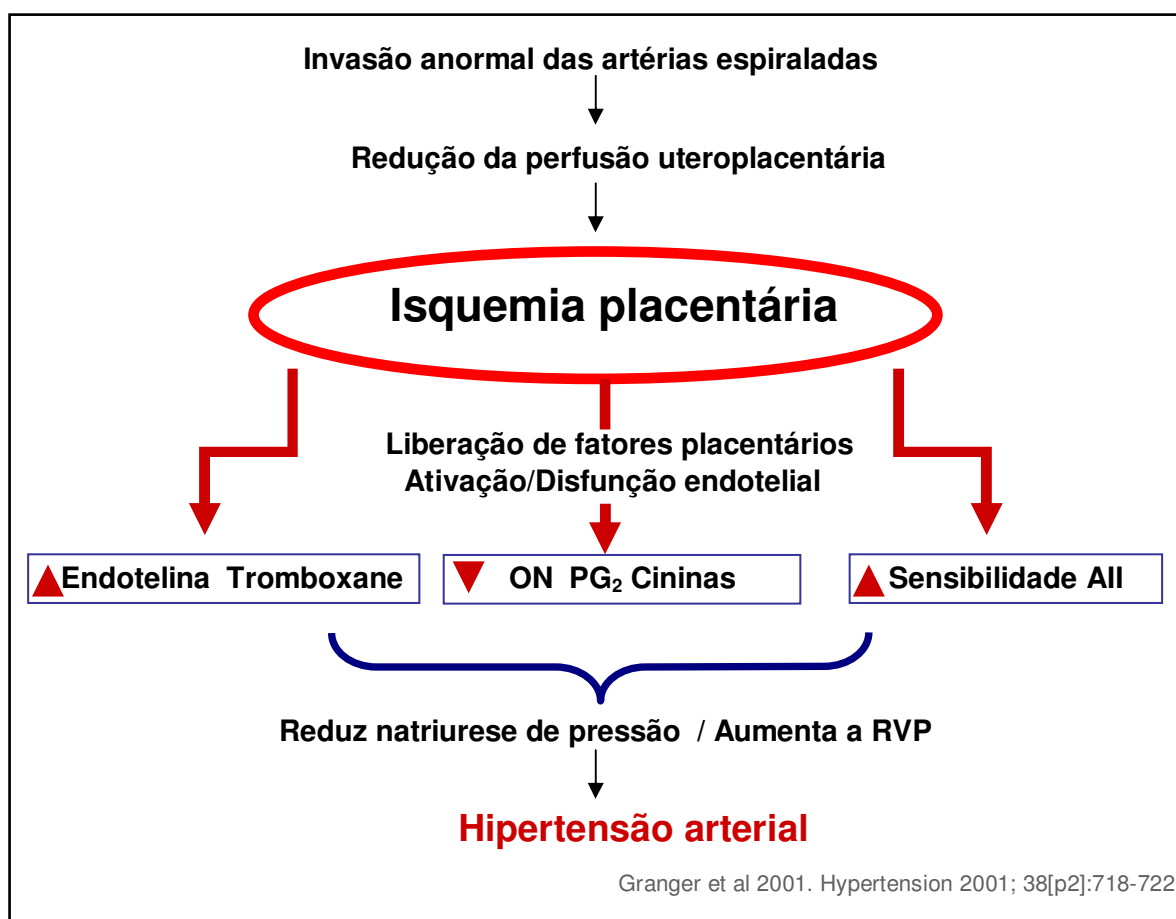


Figura 1. Potenciais mecanismos pelos quais a redução crônica da perfusão útero-placentária pode levar à hipertensão. Adaptado de Granger et al, 2001.<sup>24</sup> ON: óxido nítrico, PG2: prostaciclina, ANG II: angiotensina II, RVP: resistência vascular periférica.

Dentre os vasodilatadores, destacam-se o óxido nítrico (NO) e as prostaglandinas. O óxido nítrico é uma molécula que se difunde rapidamente para fora da célula de origem em direção às células vizinhas, onde se liga à guanosina monofosfato cíclica (GMPc) e induz relaxamento da musculatura lisa vascular.<sup>25</sup> A enzima responsável pela sua produção, a óxido nítrico sintase (NOS), é expressa no sinciciotrofoblasto, bem como no endotélio vascular umbilical e feto-placentário, onde a produção de NO contribui para a manutenção da baixa resistência vascular placentária.<sup>26,27</sup>

O aumento da síntese de NO colabora para a manutenção das adaptações fisiológicas observadas na gestação normal.<sup>27</sup> Em estudos com animais, observou-se que os metabólitos estáveis do óxido nítrico (nitrito e nitrato) encontram-se elevados em ratas prenhes.<sup>28</sup> O bloqueio não seletivo da óxido nítrico sintase resulta em alterações semelhantes às observadas na PE, como vasoconstrição renal, proteinúria, trombocitopenia e restrição de crescimento intra-uterino,<sup>20,29</sup> além de diminuir a excreção urinária dos produtos do metabolismo do óxido nítrico.<sup>28</sup>

Em humanos, diversos estudos têm tentado determinar a produção de NO investigando os níveis dos seus principais metabólitos (nitritos e nitratos) no soro e no plasma de pacientes com PE e comparando-os com gestantes normotensas. Em pré-eclâmpticas, foram descritos níveis diminuídos, similares ou aumentados em relação às gestantes controles.<sup>25,30,31,32</sup> Esses estudos podem ter sofrido interferência de diversos fatores, tais como dieta e medicações em uso.<sup>33</sup> Assim, a produção de NO durante a gestação normal e na PE ainda é controversa.

O óxido nítrico é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, que entra na célula através de transportadores. Em hemácias, foi demonstrado aumento da captação de L-arginina em gestantes normais, sendo que esse transporte sofre acréscimo ao longo do período gestacional e encontra-se ainda maior no pós-parto imediato.<sup>34</sup> Em gestantes com PE, está descrito um aumento significativo na capacidade máxima de transporte de eritrócitos comparada com gestantes normais, demonstrando que a cinética do transporte da L-arginina encontra-se alterada nesse grupo de pacientes.<sup>35</sup>

A óxido nítrico sintase apresenta três isoformas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS).<sup>36</sup> A investigação da expressão dessas isoformas no tecido renal durante a gestação de ratas demonstrou aumento da iNOS e da nNOS e redução da eNOS.<sup>37,38</sup> A análise isolada evidenciou que a inibição da isoforma neuronal em ratas prenhes resulta em diminuição do fluxo plasmático renal (FPR) e da taxa de filtração glomerular (TFG).<sup>39</sup> Os mesmos efeitos sobre os parâmetros hemodinâmicos renais foram descritos quando induzido o bloqueio agudo da isoforma induzível em ratas prenhes.<sup>40</sup> Apesar de haver diminuição da expressão no tecido renal, a atividade das isoformas dependentes de cálcio (eNOS e nNOS) aparece aumentada na fase inicial da gestação nos tecidos maternos.<sup>41</sup> Portanto, não está completamente elucidada a participação da isoforma endotelial no processo de adaptação hemodinâmica renal e sistêmica observadas na gestação, sendo esse o objetivo do Estudo 1 descrito a seguir, sob título de “Efeito da N-iminoetil-L-ornitina nas Alterações Hemodinâmicas Renais durante a Gestação”, e anexado sob forma de artigo submetido à publicação no periódico *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (Anexo 1, página 105).

O GMPc é hidroxilado pela fosfodiesterase (PDE), uma enzima presente na parede uterina de ratas prenhes e virgens. Está demonstrado que a inibição dessa enzima aumenta a vasodilatação dependente do endotélio em pequenas artérias do miométrio em gestações complicadas por PE. Estudo realizado pelo Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS observou que a atividade da fosfodiesterase em gestantes com PE é significativamente maior comparada a gestantes normais.<sup>42</sup> Esses achados sugerem que o aumento da atividade da enzima leva à degradação do segundo mensageiro GMPc, podendo reduzir a vasodilatação periférica presente na gestação normal e ocasionando aumento da pressão arterial sistêmica.

Alterações significativas na produção de prostaglandinas ocorrem em gestantes com PE,<sup>24</sup> sendo descrita a diminuição da síntese de produtos vasodilatadores, como a prostaciclina,<sup>10</sup> associado ao aumento da produção de vasoconstritores, como o tromboxano A<sub>2</sub>.<sup>33</sup> O tromboxano é um potente vasoconstritor e agregante plaquetário. Na pré-eclâmpsia, está demonstrado aumento da sua produção<sup>8</sup> e da excreção urinária de seu metabólito.<sup>20</sup> Porém, estudo investigando a produção de prostaciclina e tromboxano antes da instalação do quadro da PE, observou que mulheres que desenvolveram PE tinham níveis de prostaciclina significativamente menores comparados às gestantes que não desenvolveram a doença, o que foi documentado desde o período inicial da gravidez (13 a 16 semanas). Por outro lado, esse estudo relatou que os níveis de tromboxano em gestantes que desenvolveram PE não estavam significativamente aumentados em relação àquelas que não desenvolveram a doença<sup>43</sup>.

Além do tromboxano, outros vasoconstritores participam do controle do tônus vascular. Dentre essas substâncias, encontram-se a endotelina,<sup>20,24</sup> a renina<sup>44</sup> e os mediadores do sistema nervoso autônomo simpático.<sup>21</sup>

A maior parte dos estudos que investigou os níveis de endotelina observou um aumento em cerca de duas a três vezes em gestantes com PE quando comparados aos controles. O aumento dos níveis da endotelina ocorre principalmente na fase final da doença, podendo assim não estar envolvida diretamente na gênese, mas na progressão da doença.<sup>20</sup> Está descrito que o dano endotelial pode ser um estímulo à produção de endotelina.<sup>24</sup>

Sugere-se que a PE é um estado de hiperatividade simpática que reverte após o parto. Esse achado leva a crer que o aumento da resistência vascular periférica observado na PE pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo aumento da atividade simpática.<sup>21</sup> O sistema renina-angiotensina-aldosterona encontra-se estimulado durante a gestação normal. Em situações de PE grave, está descrito uma redução significativa da concentração sérica da aldosterona e da atividade da renina plasmática quando comparado aos controles. Esse fenômeno seria secundário à profunda vasoconstrição periférica encontrada na doença em virtude do aumento da sensibilidade aos vasoconstritores.<sup>10,44</sup>

#### Interação Materno-Fetal

Não está elucidado como a redução da perfusão placentária poderia levar a alterações vasculares generalizadas na circulação materna. Para tanto, haveria a necessidade de ocorrer liberação de um ou mais fatores vasoativos

provenientes da placenta isquêmica para a circulação materna. Muitos fatores têm sido apontados como possíveis candidatos, fazendo com que a PE seja conhecida como a doença das teorias, sendo que nenhuma delas tem sido completamente aceita e comprovada com o passar dos anos. As moléculas candidatas incluem a forma solúvel do receptor do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), a fração solúvel da endoglina, os fragmentos placentários, além das espécies ativas do oxigênio e os mediadores inflamatórios.

O fator de crescimento vascular endotelial tem um papel importante na angiogênese que, quando inadequada, pode levar à placentação defeituosa e à PE. A inserção alternativa do RNA mensageiro de um dos receptores do VEGF, o FLT1, produz uma forma solúvel desse receptor: tirosina quinase 1 placentária solúvel tipo fms (sFLT1), que se liga e gera efeito antagônico tanto ao fator de crescimento vascular quanto ao fator de crescimento placentário (PlGF). A expressão protéica do sFlt1 aparece aumentada na PE. Experimentalmente, a administração de sFlt1 no período inicial da gestação de ratas induz hipertensão, proteinúria e endoteliose glomerular. Esses achados sugerem que o excesso de sFlt1 circulante contribui para a patogênese da PE.<sup>45</sup>

A endoglina (CD105) é um receptor de superfície celular dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 3, expresso nas células endoteliais e no sinciotrofoblasto, que induz aumento no diâmetro arterial de maneira dose-dependente. Foi descrito uma nova forma solúvel da endoglina derivada da placenta que está presente no soro de gestantes, aumentada na PE e em níveis ainda maiores nas formas severas da doença. A endoglina coopera com

sFlt1 na indução do dano endotelial *in vitro* e de PE severa *in vivo*. A combinação deles mostrou um efeito aditivo no fígado, indicando que os mesmos podem agir sinergicamente na ruptura da integridade endotelial e induzir dano vascular considerável.<sup>45,46,47</sup>

Outra hipótese sugere que a hipóxia causada pela redução de perfusão placentária gera espécies ativas de oxigênio com capacidade de induzir dano endotelial.<sup>48</sup> Plaquetas, neutrófilos e monócitos, quando ativados, podem liberar espécies ativas de oxigênio.<sup>49</sup> No entanto, essas substâncias são lábeis, tornando pouco provável a produção placentária com atuação em sítios distantes. Estudo clínico inicial demonstrou que a suplementação com vitaminas C e E; utilizadas pelas suas propriedades de remoção de espécies ativas hidrofílicas e lipofílicas, respectivamente, foi benéfica para gestantes com fatores de risco para a PE.<sup>50</sup> Porém, recentes ensaios clínicos randomizados que administraram as mesmas vitaminas para pacientes com<sup>51</sup> e sem fatores de risco para PE,<sup>52</sup> demonstraram incidência semelhante ao grupo placebo, não havendo, assim, indicação de utilização profilática das mesmas durante a gestação.<sup>51,52</sup> Vale ressaltar que o estudo que investigou gestantes com fatores de risco para PE registrou maior número de recém-nascidos com baixo peso no grupo que recebeu o tratamento comparado aos controles.<sup>51</sup>

Supõe-se que um dos possíveis mecanismos ligados à gênese da PE ocorra devido à resposta inflamatória intravascular excessiva. Vários níveis de evidência corroboram a hipótese que a isquemia placentária contribui para a ativação e disfunção endotelial sistêmica através de mediadores inflamatórios.

Em nível celular, está relatada a ativação da resposta inflamatória. Tanto granulócitos quanto monócitos encontram-se ativados na pré-eclâmpsia.<sup>53</sup> Em



humanos, constatou-se que os níveis plasmáticos de interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) estão aumentados em pacientes com PE quando comparados aos controles.<sup>49</sup> Observa-se que, em relação aos níveis de TNF- $\alpha$ , ocorre um aumento em torno de duas vezes; enquanto que, referente à interleucina-6, o acréscimo é de três vezes comparado às gestantes normais.<sup>54</sup> Também está descrito aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  no líquido amniótico de pré-eclâmplicas.<sup>55</sup> Em outro estudo, foi relatado aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 associados à molécula de adesão vascular celular (VCAM), o que pode estar relacionado ao mecanismo de ativação leucocitária presente na doença.<sup>56</sup> Esses achados foram confirmados em estudos mais recentes<sup>57</sup> e nas formas mais graves da doença,<sup>58</sup> incluindo a síndrome HELLP, caracterizada por hemólise, aumento das enzimas hepáticas e plaquetopenia.<sup>59</sup>

Por outro lado, existem publicações descrevendo resultados antagônicos aos supracitados. No líquido amniótico de gestantes com PE, foi observada diminuição dos níveis de IL-6 em relação aos controles.<sup>60</sup> Quando colocado em meio de cultura, o tecido placentário de gestantes pré-eclâmplicas produziu menor quantidade de IL-6 comparado ao tecido de gestantes normais.<sup>61</sup> Além disso, medidas de IL-6 no cordão umbilical e no tecido placentário não foram significativamente diferentes em gestantes com ou sem pré-eclâmpsia.<sup>62</sup> Assim, observa-se que a participação das citocinas pró-inflamatórias na fisiopatogenia da PE não está completamente elucidada.

Em estudos com modelos animais, existem evidências sugerindo a participação das citocinas pró-inflamatórias como mediadores do aumento da pressão arterial. Devido ao fato da PE ocorrer espontaneamente apenas em

humanos e macacos mais desenvolvidos na escala evolutiva<sup>63</sup> e das limitações éticas para o estudo da sua fisiopatologia, diversos modelos animais têm sido descritos. Cada modelo concentra-se em um mecanismo específico da doença. Em ratos, os modelos incluem a indução de isquemia uterina,<sup>24</sup> o bloqueio prolongado da síntese de óxido nítrico,<sup>29</sup> a indução de hiperinsulinemia e o estresse crônico induzido através de ruídos intermitentes e superpopulação nas gaiolas,<sup>63</sup> além da ativação da resposta inflamatória sistêmica através da infusão de baixa dose de lipopolissacarídeos.<sup>64</sup> Descreve-se, ainda, a indução da ativação de proteínas que interferem na angiogênese, como a tirosina quinase 1 placentária solúvel tipo fms<sup>45</sup> e a forma solúvel da endogлина.<sup>46,47</sup> Em camundongos, modelos com animais transgênicos expressando angiotensinogênio humano buscam alterar o sistema renina-angiotensina-aldosterona.<sup>63</sup> Outro modelo trabalha com a transferência de esplenócitos ativados para o perfil Th1, pró-inflamatório, de camundongos BALB/c para fêmeas prenhes isogênicas tendo como intuito induzir resposta inflamatória excessiva.<sup>65</sup> Além desses modelos, realiza-se o cruzamento de camundongos isogênicos BPH/5 para propiciar modelos de HAS gestacional de desenvolvimento espontâneo.<sup>66</sup>

A redução crônica na pressão de perfusão útero-placentária (RUPP) em ratas, descrita inicialmente por Eder e McDonald em 1987,<sup>67</sup> é induzida entre a metade e o final da gestação através da colocação de cliques metálicos ou fio seda em torno da aorta abdominal abaixo das artérias renais, diminuindo a perfusão em torno de 35% a 45%. Esse procedimento está associado ao aumento dos níveis de pressão arterial e proteinúria em excesso. O modelo RUPP foi adaptado por Alexander usando constrição da porção inferior da

aorta abdominal, bem como de ambas as artérias ovarianas para prevenir o fluxo sanguíneo compensatório através delas (Figura 2).<sup>68</sup> Nesse estudo está descrito que o modelo RUPP é caracterizado por aumento da pressão arterial e da excreção de proteína na urina, diminuição da taxa de filtração glomerular e do fluxo plasmático renal, além de restrição de crescimento intra-uterino. Assim, observa-se que o modelo apresenta alguns dos achados descritos na doença hipertensiva gestacional em humanos.

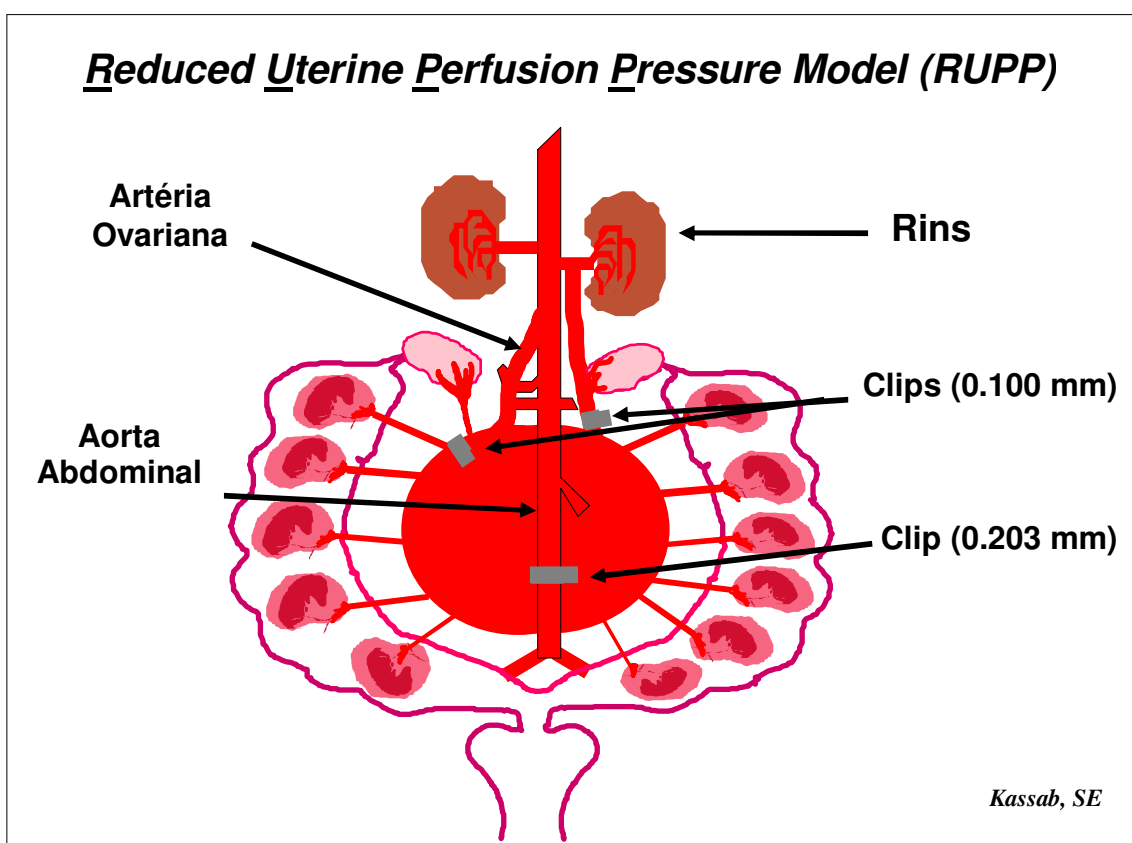


Figura 2. Representação esquemática do modelo de redução da pressão de perfusão uterina em ratas prenhes (gentilmente cedida por Kassab, SE).

Em estudos com animais submetidos ao modelo RUPP, demonstrou-se que os níveis plasmáticos do fator de necrose tumoral alfa estão duas vezes

acima daqueles encontrados em ratas prenhes controles. Adicionalmente, a infusão de TNF- $\alpha$  em ratas prenhes, elevando seus níveis séricos próximos àqueles encontrados no modelo RUPP, está associada a aumento da resistência vascular periférica e da pressão arterial.<sup>69,70</sup>

O objetivo do Estudo 2 descrito a seguir foi investigar a participação da IL-6 nas alterações hemodinâmicas sistêmicas e renais, especialmente no que se refere ao controle da pressão arterial dentro do modelo de redução da pressão de perfusão uterina em ratas prenhes. Esse estudo tem como título “Papel da Interleucina 6 na Hipertensão Produzida por Redução na Perfusão Uterina em Ratas Prenhes”. Sob forma de artigo, ele está publicado com o título de “Hypertension Produced by Reductions in Uterine Perfusion in the Pregnant Rat: Role of Interleukin 6” (Anexo 2, página 118).

## CONSIDERAÇÕES SOBRE A TESE

O Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde – FAMED / PUCRS não exige um formato específico para a apresentação da tese. Assim, foram empregadas as recomendações de Spector,<sup>71</sup> sendo que as referências bibliográficas seguiram as normas do estilo *Vancouver* e as citações indicadas no texto seguiram o sistema de citações em seqüência.

O presente trabalho faz parte da linha de pesquisa do Laboratório de Nefrologia que investiga as doenças hipertensivas ligadas à gestação. Tendo como ponto de partida os estudos sobre a via da L-arginina / óxido nítrico no Laboratório de Nefrologia, além do interesse mútuo na PE e nessa rota metabólica, estabeleceu-se uma parceria com o grupo do Dr. Joey P. Granger, que vem desenvolvendo seus experimentos no Departamento de Fisiologia e Biofísica da “University of Mississippi Medical Center” (UMC). Essa parceria foi concretizada com a realização de um “Doutorado Sanduíche”, financiado inicialmente pela UMC e posteriormente pelo CNPq. Nesse período, o autor participou de vários estudos, sendo alguns deles apresentados na presente tese. Os estudos experimentais, aqui referidos como Estudo 1 e Estudo 2, foram realizados em um dos laboratórios do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UMC. Portanto, os dados experimentais obtidos no presente trabalho foram realizados em 2003 durante a permanência do autor na cidade de Jackson, Mississippi, Estados Unidos da América.

No Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, foram desenvolvidas várias atividades relacionadas à investigação clínica das doenças hipertensivas gestacionais. Essas atividades estão ligadas

à implantação do Ambulatório de Hipertensão, confecção do protocolo de atendimento de primeira consulta e retorno, criação do banco e contínuo registro de dados (Anexo 5, página 132; Anexo 7 página 138).

Esta tese é apresentada nos seguintes capítulos: Introdução, Estudo 1, Estudo 2, Considerações Finais e Referências Bibliográficas. Também inclui nos Anexos dados do Ambulatório de Hipertensão, Atividades Científicas e outras produções científicas desenvolvidas nesse período. O Estudo 1 foi submetido ao periódico *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* e está em avaliação (Anexo 1, página 105). O Estudo 2 foi aceito e publicado no periódico *Hypertension* (Anexo 2, página 118).

## ESTUDO 1

Efeito da N-iminoetil-L-ornitina nas Alterações Hemodinâmicas Renais  
durante a Gestaçã

Giovani Gadonski <sup>1,2</sup>, Barbara T. Alexander <sup>1</sup>, Carlos E. Poli de Figueiredo <sup>2</sup>,  
Joey P. Granger <sup>1</sup>

1. University of Mississippi Medical Center

Department of Physiology and Biophysics

2500 North State Street

Jackson, MS 39216 – 4505

2. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Department of Nephrology – Biomedical Research Institution

6690 Ipiranga Avenue – São Lucas Hospital / Second Floor

Porto Alegre, RS 90610 – 000

Estudo submetido à avaliação no Brazilian Journal of Medical and  
Biological Research (Anexo 1, página 105)

## Efeito da N-iminoetil-L-ornitina nas Alterações Hemodinâmicas Renais durante a Gestação

### Resumo

A gestação está associada a alterações significativas nos parâmetros hemodinâmicos renais que são mediados por fatores como o óxido nítrico (NO). O objetivo deste estudo foi investigar o papel da isoforma endotelial da NO sintase (eNOS) como mediador dessas alterações, utilizando o inibidor mais potente da eNOS, N-iminotetil-L-ornitina: L-NIO. A administração aguda de L-NIO em ratas prenhes no décimo sexto dia de gestação diminuiu a taxa de filtração glomerular ( $2,7 \pm 0,3$  versus  $2,0 \pm 0,2$  ml/min,  $P=0,01$ ) e o fluxo plasmático renal ( $10,0 \pm 1,0$  versus  $6,7 \pm 0,8$  ml/min,  $P=0,01$ ), bem como aumentou a resistência vascular renal ( $8,8 \pm 1,3$  versus  $15,3 \pm 3,3$  mmHg/ml/min,  $P<0,05$ ). L-NIO não induziu efeitos hemodinâmicos significativos em ratas virgens. Portanto, esses achados sugerem que a eNOS pode ter um papel importante nas alterações hemodinâmicas renais durante a gestação em ratas.



## Abstract

Pregnancy is associated with marked increases in renal hemodynamics that are mediated by factors such as nitric oxide (NO). The purpose of this study was to investigate the role of endothelial NO synthase (eNOS) in mediating these changes using the most potent eNOS inhibitor (N-iminoethyl-L-ornithine: L-NIO). Acute administration of L-NIO in pregnant rats (day 16 of gestation) decreased glomerular filtration rate ( $2.7 \pm 0.3$  versus  $2.0 \pm 0.2$  ml/min,  $P=0.01$ ) and renal plasma flow ( $10.0 \pm 1.0$  versus  $6.7 \pm 0.8$  ml/min,  $P=0.01$ ) as well as increased renal vascular resistance ( $8.8 \pm 1.3$  versus  $15.3 \pm 3.3$  mmHg/ml/min,  $P<0.05$ ). L-NIO had no renal hemodynamic effects in virgin rats. Therefore, these findings suggest that eNOS may play a role in renal hemodynamic changes during pregnancy.

## Introdução

Durante a gestação normal, ocorrem alterações significativas nos parâmetros hemodinâmicos renais e sistêmicos. Comparados aos valores prévios à gravidez, existe um aumento de 40% a 65% na taxa de filtração glomerular e de 50% a 85% no fluxo plasmático renal estabelecidos no período inicial e que se estende até a metade da gestação.<sup>72,73</sup> Aumento na taxa de filtração glomerular ocorre em paralelo aos acréscimos no fluxo plasmático renal, volume sanguíneo sistêmico e débito cardíaco.<sup>72</sup> Esses acréscimos nos parâmetros hemodinâmicos renais estão relacionados à queda na resistência vascular renal (RVR), bem como ao decréscimo da resistência periférica total.<sup>74</sup>

A produção de óxido nítrico está aumentada durante a gestação em ratas.<sup>28</sup> Redução no débito cardíaco, fluxo sanguíneo renal, cardíaco, pulmonar, hepático, diafragmático e muscular esquelético ocorre em resposta à inibição crônica não seletiva da óxido nítrico sintase,<sup>75</sup> que também gera hipertensão sustentada, proteinúria, dano glomerular, trombocitopenia e restrição de crescimento intra-uterino.<sup>29</sup> O bloqueio agudo não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS) em ratas prenhes inibe a vasodilatação e a hiperfiltração renal característicos da gestação.<sup>76</sup> Esses achados fortemente sugerem que o NO exerce um papel importante nas alterações hemodinâmicas sistêmicas, hiperfiltração e vasodilatação renal característicos da gestação.<sup>27,74</sup>

A formação de NO a partir da arginina é catalisada pela NOS, uma enzima que apresenta três isoformas, podendo ser classificadas em induzível (iNOS) e constitutivas: endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS).<sup>36</sup> Está descrito que a expressão protéica dessas três isoformas é diferente no tecido renal

durante a gestação em ratas. Foi constatado aumento na expressão da iNOS e da nNOS, com expressão normal da eNOS.<sup>37</sup> Também foram estabelecidos os papéis da iNOS e da nNOS em ratas prenhes.<sup>40,39</sup> A infusão do inibidor específico da nNOS, o 7-nitroimidazol (7-NI), nesses animais reduziu o FPR e a TFG em torno de 25%, aumentando a resistência vascular renal em, aproximadamente, 60%.<sup>39</sup> O bloqueio da iNOS também atenuou o aumento da TFG e do FPR em ratas prenhes.<sup>40</sup>

Apesar de alguns estudos descreverem que a gestação está associada a aumento da atividade das isoformas constitutivas (eNOS, nNOS) no tecido renal,<sup>41,77</sup> foi demonstrado previamente que não há alterações significativas na expressão da eNOS nesse tecido em ratas prenhes.<sup>37,38</sup> Portanto, a contribuição da eNOS nas alterações hemodinâmicas renais durante a gestação não está elucidada. A isoforma endotelial da NOS é inibida de uma maneira enantiomericamente específica pela N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO), que tem sido utilizada como um inibidor putativo ou relativamente seletivo da eNOS.<sup>78-84</sup> O objetivo deste estudo foi investigar o papel da eNOS nas alterações hemodinâmicas renais ocorridas durante a gestação. Para alcançá-lo, foram determinados os efeitos da L-NIO (Cayman Chemical, Michigan) em ratas cronicamente instrumentadas, em vigília, durante o décimo sexto dia de gestação.

## Material e Métodos

Todos os estudos foram realizados em ratas Sprague-Dawley com idade entre 10 e 12 semanas, no décimo segundo dia de gestação, e em ratas virgens adquiridas junto à Harlan Sprague-Dawley Inc (Indianápolis, Ind). Os animais foram alojados individualmente e mantidos com ração padrão *ad libitum* e água potável em uma sala com temperatura controlada (23° C) com ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações do “National Institutes of Health” e da “American Physiological Society”, sendo que os protocolos foram aprovados pelo comitê para uso e cuidados de animais da “University of Mississippi Medical Center”.

Os animais foram divididos em dois grupos: virgens (n=13) e prenhes (n=15). Cada grupo serviu como seu próprio controle. No décimo segundo dia de gestação, as ratas prenhes foram instrumentadas para colocação de cateteres. Sob anestesia com isoflurano a 2%, os cateteres (PE-50) foram inseridos na artéria femoral esquerda para possibilitar coleta de sangue e medida da pressão arterial e na veia femoral esquerda para administração de drogas. Cada cateter foi preenchido com solução de heparina e soro fisiológico (50:50). Uma incisão abdominal mediana foi realizada para canulação da bexiga com tubo PE-90, permitindo a coleta de urina durante o experimento. Todos os cateteres foram guiados subcutaneamente para a porção posterior do pescoço e exteriorizados. Após quatro dias de recuperação, foram realizadas as medidas hemodinâmicas renais e de pressão arterial.

No décimo sexto dia de gestação, as ratas foram posicionadas em gaiolas de restrição para as medidas dos parâmetros hemodinâmicos renais e sistêmicos.<sup>75</sup> Os cateteres foram testados com solução de heparina a 20%. As cânulas posicionadas na veia femoral foram conectadas a uma bomba de infusão contendo solução fisiológica com [<sup>125</sup>I] iotalamato (Isotex Diagnostics) a 0,05 mCi/Kg/min e ácido para-aminohipúrico (PAH 24 mg/ml, Sigma Chemical Co) a uma velocidade de 3 ml/h. A pressão arterial foi monitorizada nos animais em vigília através de um transdutor de pressão. Após a infusão inicial em bolus de 3 ml da solução supracitada, foi mantida a administração numa velocidade de 3 ml/h durante 60 minutos para estabilização dos animais. A seguir, foi cronometrado um período controle de 30 minutos para coleta de urina e registro da pressão arterial. Ao final, foram coletadas amostras de sangue. O volume urinário foi determinado por gravimetria.

Após o período controle, L-NIO (20 mg/Kg) foi infundida em bolus pelo cateter venoso, e outro período de estabilização de 60 minutos foi cronometrado. Realizou-se, então, a segunda coleta de urina e medida de PA durante 30 minutos, seguidos de nova retirada de amostra de sangue. As amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas para separação e coleta de plasma. Amostras de plasma e urina foram levadas ao contador gama para medida da radiação emitida pelo iotalamato, permitindo o cálculo da taxa de filtração glomerular através da seguinte fórmula:

Taxa de filtração glomerular = (concentração de Iotalamato na urina multiplicado pelo volume de urina) / concentração de Iotalamato no plasma.<sup>85</sup> O fluxo plasmático renal foi calculado através das concentrações do PAH no plasma e na urina medidas por colorimetria, sendo expressos em mililitros por

minuto (ml/min).<sup>37</sup> A resistência vascular renal foi calculada dividindo a PA pelo fluxo plasmático renal.<sup>69</sup>

N-iminoetil-L-ornitina é o inibidor mais potente da eNOS.<sup>86,87</sup> L-NIO tem sido utilizado como inibidor seletivo da eNOS em doses que variam de 10 a 30 mg/Kg.<sup>78-80</sup>

### Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como média e erro padrão (SE). Comparações estatísticas dos grupos virgens controle e prenhes controles versus virgens tratadas e prenhes tratadas com L-NIO foram realizadas através de teste *t* Student emparelhado. Comparações entre grupos virgens e prenhes em condições basais, ou após a infusão de L-NIO, foram feitas através de teste *t* Student não emparelhado. Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### Resultados

O peso médio das ratas virgens foi de  $228 \pm 4$  g, enquanto as prenhes apresentaram média de  $276 \pm 5$  g no décimo sexto dia de gestação. Em condições basais, não houve diferença significativa entre a pressão arterial média (PAM) do grupo ratas virgens ( $116 \pm 5$  mmHg) e prenhes ( $108 \pm 2$  mmHg). A infusão aguda de L-NIO não gerou efeitos expressivos sobre a PA do grupo virgens ( $111 \pm 4$  mmHg) ou prenhes ( $109 \pm 2$  mmHg, Figura 3a).

A taxa de filtração glomerular apresentou aumento de 42% nas ratas prenhes no décimo sexto dia de gestação ( $2,7 \pm 0,3$  ml/min) quando comparada com ratas virgens ( $1,9 \pm 0,3$  ml/min). A infusão aguda de L-NIO nas ratas prenhes resultou em um decréscimo significativo da TFG comparado às condições basais ( $2,7 \pm 0,3$  versus  $2,0 \pm 0,2$  ml/min;  $P=0,01$ ). Entretanto, a administração de L-NIO não foi associada a efeito significativo sobre a TFG em ratas virgens ( $1,9 \pm 0,3$  versus  $1,8 \pm 0,2$  ml/min, Figura 3b).

Como demonstrado na Figura 3c, o fluxo plasmático renal foi significativamente maior nas ratas prenhes no décimo sexto dia de gestação ( $10 \pm 1,0$  ml/min) comparado às virgens ( $7,0 \pm 1,0$  ml/min,  $P<0,05$ ). Infusão aguda de L-NIO nas ratas prenhes resultou em decréscimo significativo no FPR ( $10 \pm 1,0$  ml/min versus  $6,7 \pm 0,8$  ml/min,  $P=0,01$ ), porém, não houve efeito significativo nas ratas virgens ( $7,0 \pm 1,0$  ml/min versus  $6,3 \pm 0,7$  ml/min).

A resistência vascular renal foi significativamente menor nas ratas prenhes no décimo sexto dia de gestação sob condições basais ( $8,8 \pm 1,3$  mmHg/ml/min) em relação às ratas virgens ( $14,4 \pm 1,8$  mmHg/ml/min,  $P=0,01$ ). Adicionalmente aos efeitos sobre a TFG e o FPR, L-NIO aumentou a RVR nas ratas prenhes de  $8,8 \pm 1,3$  mmHg/ml/min para  $15,3 \pm 3,3$  mmHg/ml/min ( $P<0,05$ ). Esse achado não foi observado nas ratas virgens ( $14,4 \pm 1,8$  versus  $14 \pm 1,5$  mmHg/ml/min, Figura 3d).

## Discussão

As medidas hemodinâmicas renais durante a metade da gestação de ratas em vigília, cronicamente instrumentadas com cateteres, demonstram que a TFG e o FPR estão em torno de 26% e 20%, respectivamente, acima dos controles não prenhes. Esses parâmetros sofrem um decréscimo na fase final da gestação semelhante ao descrito em humanos.<sup>72</sup>

Evidências indicam que a síntese de NO aumenta na circulação materna durante a gestação, sendo necessária para as adaptações hemodinâmicas renais.<sup>75</sup> A inibição não seletiva da NOS anula os acréscimos hemodinâmicos renais em ratas prenhes.<sup>76</sup> Está descrito que a expressão renal das isoformas induzível e neuronal encontram-se aumentadas durante a gestação em ratas, e ambas são importantes mediadores das alterações hemodinâmicas que ocorrem nesse período.<sup>37,39,40</sup> Entretanto, esse fenômeno não ocorre com a eNOS.<sup>37</sup> Apesar da expressão renal da eNOS ser normal nesse período, um aumento significativo na atividade das isoformas dependentes de cálcio foi demonstrada.<sup>41,77</sup> Esse achado poderia indicar um aumento na atividade da eNOS. Assim, a importância da eNOS nas alterações hemodinâmicas renais durante a gestação não está elucidada.

Para examinar a potencial contribuição da eNOS nas alterações hemodinâmicas renais durante a gestação, foi utilizado um inibidor irreversível da eNOS, a L-NIO. Essa droga é, aproximadamente, quatro vezes mais potente inibidor da eNOS do que os outros análogos da arginina.<sup>78</sup> A L-NIO tem sido utilizada como um inibidor seletivo da eNOS em doses variando de 10 a



30 mg/Kg.<sup>79,80</sup> A infusão aguda da droga provoca início imediato dos efeitos, alcançando seu platô em, aproximadamente, oito minutos.<sup>78</sup>

A administração de 20 mg/Kg de L-NIO resultou na atenuação das alterações hemodinâmicas que ocorrem durante a metade da gestação. Neste estudo, a TFG e o FPR foram 42% maior em ratas prenhes comparados às ratas virgens controles. Além disso, a RVR encontrava-se reduzida em 63% nas ratas prenhes comparada às virgens. A infusão aguda de L-NIO no décimo sexto dia de gestação resultou em aumento significativo da RVR e diminuição do FPR e TFG. Em contraste, a administração de L-NIO em ratas virgens não gerou efeitos significativos sobre esses parâmetros. Apesar dos resultados indicarem um potencial papel da eNOS nas alterações hemodinâmicas durante a gestação, não se pode descartar a possibilidade de a L-NIO estar também afetando as outras isoformas da NOS, que são reconhecidas por ter um papel importante nessas modificações.

Decréscimo significativo da PAM normalmente ocorre no período final da gestação em ratas prenhes.<sup>37</sup> Neste estudo, não houve diferença significativa na PAM entre ratas prenhes e virgens no período que antecedeu a infusão da droga, uma observação igualmente referida em outros experimentos.<sup>39,40</sup> A administração aguda de L-NIO não gerou efeitos significativos sobre a PAM de ratas virgens ou prenhes. No entanto, quando estudados ratos machos sob anestesia, houve aumento na PAM após a infusão da droga.<sup>78</sup> Camundongos geneticamente modificados, que não expressam a isoforma endotelial da NOS, têm aumento significativo, em torno de 15 mmHg, da PA sistólica quando comparados aos controles em vigília e repouso. Porém, essa diferença

desaparece durante a gestação,<sup>88,89</sup> indicando que a PAM não é diretamente controlada pela eNOS durante esse período.

### Conclusão

Em resumo, a gestação está associada a um importante aumento nos parâmetros hemodinâmicos renais e sistêmicos, que são mediados por fatores como o óxido nítrico. Para investigar o papel da eNOS nessas modificações, foi utilizado o mais potente inibidor dessa isoforma descrito até o momento (N-iminoetil-L-ornitina: L-NIO). A administração aguda da droga em ratas prenhes diminuiu a taxa de filtração glomerular e o fluxo plasmático renal, bem como aumentou a resistência vascular renal. Em contraste, L-NIO não apresentou efeitos hemodinâmicos significativos em ratas virgens. Esses achados sugerem que a eNOS pode ter um papel importante como mediador das alterações hemodinâmicas renais ocorridas durante a gestação.

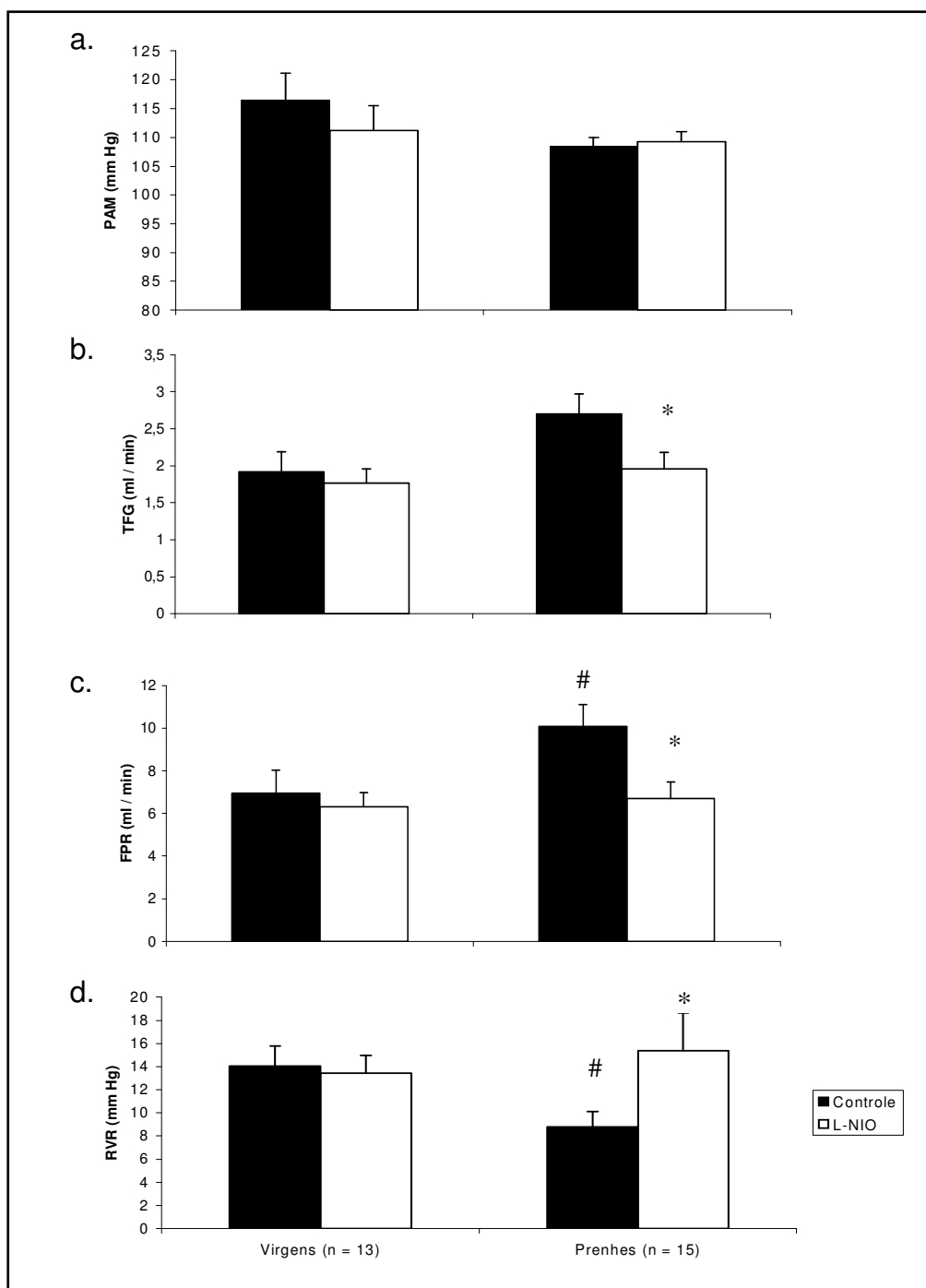


Figura 3. Alterações na PAM (3a), TFG (3b), FPR (3c) e RVR (3d) em resposta à infusão intravenosa aguda de L-NIO (20 mg/kg) em ratas virgens e prenhes em vigília. Todos os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão (SE). \*  $P < 0,05$  versus prenhes controles # versus virgens controles.

## ESTUDO 2

Papel da Interleucina 6 na Hipertensão Produzida por Redução na  
Perfusão Uterina em Ratas Prenhes

Giovani Gadonski, B. Babbette D. LaMarca, Elizabeth Sullivan, William  
Bennett, Derrick Chandler, Joey P. Granger

Estudo publicado no periódico Hypertension (Anexo 2, página 118)

## Papel da Interleucina 6 na Hipertensão Produzida por Redução na Perfusão Uterina em Ratas Prenhes

### Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar o papel da interleucina 6 (IL-6) como mediadora do aumento da pressão arterial (PA) em resposta à redução crônica da pressão de perfusão uterina (RUPP) em ratas prenhes. A pressão arterial foi maior em ratas submetidas ao modelo RUPP ( $138 \pm 1$  mmHg) em relação às ratas prenhes normais (PN;  $104 \pm 1$  mmHg). Os níveis séricos de IL-6 nas ratas com redução de perfusão uterina foram de  $104,5 \pm 28,6$  pg/ml comparados com  $36,6 \pm 7,4$  pg/ml em ratas PN. Para determinar os efeitos a longo prazo induzidos pelo aumento de 2 a 3 vezes nos níveis séricos de IL-6 sobre a função renal e pressão arterial em ratas prenhes, foi infundido IL-6 durante 5 dias ( $2,5$  ng/dia) em ratas PN, iniciando no décimo quarto dia de gestação. Cinco dias após, os níveis séricos de IL-6 foram de  $55,5 \pm 6,5$  pg/ml em ratas PN controles e  $157,0 \pm 36,1$  pg/ml em ratas PN tratadas com IL-6. A pressão arterial foi significativamente maior nas ratas PN tratadas com IL-6 ( $115 \pm 3$  mmHg) quando comparada com ratas PN controles ( $101 \pm 1$  mmHg) no décimo nono dia de gestação. O fluxo plasmático renal e a taxa de filtração glomerular foram menores nas ratas PN tratadas com IL-6 em relação ao grupo PN controle. A IL-6 aumentou a atividade plasmática da renina, mas não alterou significativamente a expressão renal bem como os níveis de endotelina nas ratas PN tratadas com IL-6. Em contraste às ratas PN, a IL-6 não induziu efeitos significativos na pressão arterial e nos parâmetros hemodinâmicos

renais em ratas virgens. Em suma, esses dados indicam que a IL-6 encontra-se elevada em resposta à redução crônica na pressão de perfusão uterina em ratas prenhes e que a elevação similar de IL-6 aumenta a pressão arterial e reduz a função e os parâmetros hemodinâmicos renais em ratas prenhes.

## Abstract

The purpose of this study was to determine the role of interleukin-6 (IL-6) in mediating the increase in arterial pressure (AP) in response to chronic reductions in uterine perfusion pressure (RUPP) in pregnant rats. AP was higher in RUPP rats ( $138 \pm 1$  mmHg) than in normal pregnant (NP) rats ( $104 \pm 1$  mmHg). Serum IL-6 levels in the RUPP rats were  $104.5 \pm 28.6$  pg/mL as compared with  $36.6 \pm 7.4$  pg/mL in NP rats. To determine the long-term effects of a 2 to 3 fold elevation in plasma IL-6 on renal function and AP in pregnant rats, we infused IL-6 for 5 days (2.5 ng/day) in NP rats starting at day 14 of gestation. Five days later, serum IL-6 levels were  $55.5 \pm 6.5$  pg/mL in the control NP rats and  $157.0 \pm 36.1$  pg/mL in the IL-6-treated NP rats. AP was higher in the IL-6-treated NP rats ( $115 \pm 3$  mmHg) as compared with NP controls ( $101 \pm 1$  mmHg) at day 19 of gestation. Renal plasma flow (RPF) and glomerular filtration rate (GFR) were lower in the IL-6-treated NP rats than in the NP group. IL-6 increased plasma renin activity but did not affect endothelin in IL-6-treated NP rats. In contrast to the NP rats, IL-6 had no effect on AP or renal hemodynamics in virgin rats. In summary, these data indicate that plasma IL-6 is elevated in response to chronic reductions in uterine perfusion in pregnant rats and that a comparable elevation in plasma IL-6 increases AP and reduces renal function in pregnant rats.

## Introdução

As citocinas inflamatórias, tais como a interleucina-6 e o fator de necrose tumoral alfa, são aventadas como possíveis elos no processo de ligação entre a isquemia placentária e as disfunções cardiovasculares e renais encontradas na pré-eclâmpsia.<sup>49,54,55,90</sup> Os estudos descrevendo níveis plasmáticos aumentados de TNF- $\alpha$  e IL-6 em mulheres com PE sustentam a participação das citocinas nessa patologia.<sup>49,54,55,56,90</sup> Alguns sistemas fundamentais para o controle da pressão arterial, tais como renina-angiotensina-aldosterona,<sup>91-94</sup> sistema nervoso autonômico simpático<sup>95</sup> e fatores endoteliais<sup>96</sup> interagem com a IL-6 e o TNF- $\alpha$ .<sup>91-96</sup> A angiotensina II aumenta a síntese de TNF- $\alpha$  e IL-6. Também é sugerido que a IL-6 pode exercer um papel importante como mediador na hipertensão induzida por angiotensina II em camundongos.<sup>93</sup> As citocinas induzem ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e aumentam a descarga simpática, manifestada pelo aumento dos níveis séricos de adrenalina, o que se traduz em aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial.<sup>95</sup> As citocinas pró-inflamatórias também afetam as funções vasculares e os fatores derivados do endotélio envolvidos no controle da pressão arterial.<sup>96-100</sup> A via de relaxamento vascular mediada por óxido nítrico e guanosina monofosfato cíclica (GMPc) dependente do endotélio é inibida em vasos sistêmicos de ratas prenhes tratadas com IL-6<sup>99</sup> e TNF- $\alpha$ .<sup>100</sup> Está demonstrado que tanto o TNF- $\alpha$  como a IL-6 induzem alterações estruturais e funcionais nas células endoteliais.<sup>101,102</sup> Além de aumentar a permeabilidade das células endoteliais,<sup>96</sup> essas citocinas alteram a produção de várias



substâncias sintetizadas pelo endotélio e diminuem a vasodilatação induzida por acetilcolina.<sup>96-100,103</sup> Portanto, a disfunção endotelial associada a diversas formas de hipertensão pode ser, pelo menos em parte, mediada por citocinas pró-inflamatórias.

Apesar das citocinas supracitadas terem sido relatadas como aumentadas em gestantes com PE, a importância dessas substâncias como mediadores das alterações renais e cardiovasculares em resposta à isquemia placentária durante a gestação não está completamente elucidada. Estudos publicados previamente demonstraram que a redução crônica da pressão de perfusão uterina (modelo RUPP) em ratas prenhes aumenta a pressão arterial e diminui o fluxo plasmático renal, bem como a taxa de filtração glomerular, além de estar associada ao aumento da excreção de proteína na urina.<sup>24,69,102,104-106</sup> Além disso, foi relatado recentemente que os níveis séricos de TNF- $\alpha$  estão elevados em ratas submetidas ao modelo RUPP, e que a infusão crônica de TNF- $\alpha$  em ratas prenhes aumenta a PA e diminuiu o FPR e a TFG.<sup>69</sup> O TNF- $\alpha$  pode ativar outros mediadores inflamatórios, como a IL-6,<sup>49,103</sup> sendo relatado aumento dos níveis séricos de IL-6 em gestantes com PE.<sup>49,90</sup> Apesar dessa associação, não está claro se a hipertensão associada ao modelo RUPP está relacionada ao aumento dos níveis plasmáticos de IL-6, tampouco se a IL-6 contribui significativamente para a hipertensão encontrada no modelo de redução crônica na perfusão uterina em ratas prenhes. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar o papel da IL-6 como mediador das alterações cardiovasculares e renais observadas durante a redução crônica da pressão de perfusão uterina em ratas prenhes. Para alcançar esse objetivo,

investigou-se primeiramente se a hipertensão encontrada no modelo RUPP em ratas prenhes está associada à elevação dos níveis séricos de IL-6. O segundo objetivo foi observar os efeitos da infusão de IL-6 sobre os parâmetros hemodinâmicos renais e sobre a PA em ratas prenhes cronicamente instrumentadas, bem como em ratas virgens, alcançando níveis plasmáticos que mimetizassem aqueles observados no modelo RUPP. Devido ao fato de os sistemas de controle de pressão, tais como renina-angiotensina-aldosterona<sup>91-94</sup> e endotelina,<sup>106,107</sup> interagirem com as citocinas pró-inflamatórias, também foram investigados os efeitos da IL-6 sobre a produção de endotelina e na atividade plasmática da renina.

## Materiais e Métodos

### Animais

Todos os estudos foram realizados em ratas Sprague-Dawley prenhes e virgens, com idades correspondentes entre os grupos, adquiridas junto à Harlan Sprague Dawley Inc (Indianapolis, Ind.). Os animais foram alojados em caixas individuais e mantidos com ração padrão *ad libitum* e água potável em uma sala com temperatura controlada (23° C) com ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os procedimentos experimentais executados neste estudo estavam de acordo com as recomendações do “National Institutes of Health” para uso e cuidados de animais, e foram aprovados pelo “Institutional Animal Care and Use Committee of University of Mississippi Medical Center”.

### Redução crônica da pressão de perfusão uterina (RUPP)

Os experimentos foram realizados nos seguintes grupos de animais: ratas prenhes normais (PN) controles (n=16) e prenhes submetidas ao modelo RUPP (n=10). Todos os animais submetidos ao procedimento cirúrgico foram anestesiados com isoflurano a 2% (W.A. Butler Co) administrado através de aparato anestésico (Vaporizer for Forane Anesthetic, Ohio Medical Products). As ratas prenhes do grupo RUPP foram submetidas à colocação de cliques metálicos no décimo quarto dia de gestação.

Após uma incisão na linha média do abdômen, a porção inferior da aorta foi isolada e um clipe de prata (0,203 mm de diâmetro interno) foi posicionado em torno da aorta, acima da bifurcação ilíaca. Devido ao mecanismo compensatório de acréscimo de fluxo sanguíneo para a placenta através do

fluxo ovariano, os ramos das artérias ovarianas esquerda e direita também foram envolvidos por um clipe de prata (0,100 mm de diâmetro interno) como previamente descrito e realizado no laboratório de fisiologia da UMC (Figura 2).<sup>69,104-106</sup>

As ratas também foram instrumentadas cirurgicamente com cateter na artéria carótida direita para medida da pressão arterial. O registro da pressão arterial e a coleta das amostras de sangue foram obtidos no décimo nono dia de gestação.

#### Pressão arterial e hemodinâmica renal

Os experimentos foram realizados nos seguintes grupos de animais: ratas prenhes controle (n=9) e ratas PN tratadas com IL-6 (2,5 ng/dia; n=9). A IL-6 (Recombinant Rat IL-6, R&D Systems) foi infundida durante cinco dias em ratas prenhes normais entre o décimo quarto e o décimo nono dia de gestação. Estudos preliminares realizados no laboratório indicaram que a infusão de IL-6 a 2,5 ng/dia era a dose adequada para atingir os níveis plasmáticos comparáveis àqueles medidos em amostras de ratas submetidas ao modelo RUPP em outros experimentos (vide estudo piloto no Anexo 3, página 124). Experimentos adicionais foram realizados em ratas virgens controle (n=9) e virgens tratadas com IL-6 (2,5 ng/dia por 5 dias; n=9) para observação da pressão arterial e dos efeitos da IL-6 sobre os parâmetros hemodinâmicos renais.

Após indução anestésica com isoflurano, as ratas prenhes no décimo quarto dia de gestação foram instrumentadas cirurgicamente com cateteres (tubos PE 50) na veia femoral e artéria carótida para coleta de sangue e

monitorização da pressão arterial. Ratas virgens também foram submetidas ao mesmo procedimento, porém foi abordada a artéria femoral, uma vez que nesses grupos não havia cliques metálicos.

A administração da IL-6 em ratas virgens e prenhes foi realizada através de cateteres na veia jugular conectados a mini-bombas osmóticas de infusão (modelo 2002, Alzet Scientific Corporation) previamente preenchidas com solução contendo IL-6 na dose citada. No mesmo procedimento, foi realizada uma incisão na linha média do abdômen, porção inferior da parede abdominal, para introdução de cateter confeccionado com tubo PE-90 na luz da bexiga, possibilitando, assim, a coleta de urina. Todos os cateteres foram guiados pelo subcutâneo para a região cervical posterior e então exteriorizados.

As medidas dos parâmetros hemodinâmicos renais e da PA foram determinadas em ratas prenhes controle e ratas prenhes tratadas com IL-6 no décimo nono dia de gestação. Após a colocação dos animais em gaiolas de restrição, foi aguardado um período de estabilização, que permitiu o acesso às extremidades dos cateteres.

Inicialmente, o cateter introduzido na artéria carótida ou femoral, de acordo com o grupo, foi conectado a um transdutor de pressão, que teve o sinal amplificado e conduzido a um dispositivo com capacidade de armazenar os valores obtidos. O cateter da veia femoral foi conectado a uma seringa contendo solução salina isotônica com [ $^{125}$ I] iotalamato (Isotex Diagnostics; 0,05 mCi/Kg/min) e ácido para-aminohipúrico (PAH; 24 mg/ml, Sigma Chemical Co). Após a administração inicial de 3 ml em bolus, foi mantida a administração da solução a 3 ml/h através de bomba de infusão.

Para determinação da taxa de filtração glomerular, foi realizada a coleta de urina durante dois períodos de 20 minutos. Após cada período, foi determinado o volume urinário por gravimetria e coletadas amostras de 0,5 ml de sangue em tubos heparinizados. A seguir, foi infundido o mesmo volume de solução fisiológica. As amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas para separação e coleta de plasma. Isoladamente, as amostras de plasma e urina foram levadas ao contador gama para medida da radiação emitida pelo Iotalamato, permitindo o cálculo da taxa de filtração glomerular através da seguinte fórmula:

Taxa de filtração glomerular = (concentração de Iotalamato na urina multiplicado pelo volume de urina) / concentração de Iotalamato no plasma.<sup>85</sup>

O fluxo plasmático renal foi calculado através das concentrações do PAH no plasma e na urina medidas por colorimetria, sendo expressos em mililitros por minuto (ml/min).<sup>37</sup> A resistência vascular renal foi calculada dividindo a PA pelo fluxo plasmático renal.<sup>69</sup>

Após a segunda coleta de urina, os ratos foram anestesiados (isofluorano 2%), e uma incisão na linha média abdominal foi realizada para acessar a aorta e realizar a coleta de sangue para armazenamento em vidros recobertos com silicone (Sherwood Medical Co) utilizando agulhas tamanho 19G <sup>3</sup>/<sub>4</sub> (Becton Dickinson Vacutainer Systems). O soro foi separado e mantido a -80° C. Outras amostras foram retiradas e colocadas em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), centrifugadas para separação do plasma e armazenadas a -20° C. Os rins foram removidos para a medida de pré-pró endotelina.

#### Determinação dos níveis séricos de interleucina-6

O método ELISA foi utilizado para quantificação dos níveis séricos de IL-6. Um anticorpo monoclonal específico para IL-6 de ratos encontrava-se previamente fixado na microplaca a ser utilizada, tendo sido essa adquirida junto à R&D Systems. As soluções padrão, controle e as amostras de plasma diluídas foram pipetadas em cada poço, a fim de permitir a ligação de qualquer IL-6 presente com o anticorpo citado. Após, um anticorpo policlonal ligado à enzima foi adicionado, assim como a solução com substrato, iniciando a reação enzimática que resultou em um produto azul, que se tornou amarelo com a colocação da solução empregada a fim de parar a reação. A intensidade da coloração foi medida, sendo proporcional à quantidade de IL-6. Os valores das amostras foram, então, lidos de acordo com a curva-padrão. A precisão inter e intraensaio foi de 10% e 8,8%, respectivamente. Esse método possui um nível de sensibilidade de < 10 pg/ml.

#### Medida da concentração plasmática de endotelina

Os níveis plasmáticos de endotelina foram determinados utilizando o método ELISA (R&D Systems). A endotelina foi isolada de 1,0 ml de plasma em 1,5 ml de solvente para extração (40:1:5, acetona: 1 N HCl:água). O procedimento para extração foi realizado seguindo o protocolo de preparação das amostras encontrado nas instruções do fabricante. O princípio do método utilizado é o mesmo descrito na dosagem de interleucina-6, mudando o anticorpo previamente fixado na microplaca do ensaio, bem como as soluções padrão e controle, o substrato e a calibração do aparelho para leitura da coloração emitida pela reação enzimática.

A precisão inter e intraensaio foram de 4,5% e 6,5%, respectivamente. O nível mínimo detectável de endotelina 1 (ET-1) foi  $< 1,0$  pg/ml.

#### Determinação dos níveis de pré-pró endotelina renal

Uma vez que os níveis de endotelina no plasma podem não ser detectados, investigou-se a formação da molécula precursora da endotelina no tecido renal com intuito de investigar os mecanismos envolvidos nas alterações dos parâmetros hemodinâmicos estudados. Para determinar os efeito da IL-6 na produção renal de endotelina, foram examinados os níveis de RNA mensageiro (mRNA) da pré-pró endotelina no tecido renal. O córtex e medula renal de 6 animais PN e 8 ratas prenhes tratadas com IL-6 foram separados imediatamente após a coleta e rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}$  C. O RNA total foi extraído usando o “kit tottally RNA” fornecido pela Ambion após o córtex e a medula terem sido triturados em nitrogênio líquido. O isolamento foi então realizado seguindo as orientações do fabricante. Brevemente, realizou-se centrifugação dos tecidos para separação dos debris celulares, seguida por adição da solução de extração (fenol e clorofórmio) e isopropanol, que foram mantidos a  $-20^{\circ}$  C e centrifugados. Foi removido o supernadante e lavado com etanol. As amostras foram acondicionadas em frascos para serem mantidos a  $-80^{\circ}$  C, permitindo a posterior conclusão do processo.

O DNA foi digerido com DNase 1 seguindo as instruções da Ambion. O RNA foi quantificado por espectrofotometria usando o “Eppendorf BioPhotometer”. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de  $5 \mu\text{g}$  de RNA com “Invitrogen’s Superscript II” transcriptase reversa usando os



seguintes “primers”: pré pró-endotelina “forward” 1: ctaggtctaagcgatccttg e pré pró-endotelina “reverse” 1: tctttgtcfcgcttgcc, fornecidos pela Life Technologies.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foi realizada com o “BioRad Sybre Green” e “iCycler” usando um “nested forward primer”, pré-pró endotelina “forward” 2: ctaggtctaagcgatccttg e o “primer” reverso descrito acima. Beta-actina foi usada como gene de expressão constitutiva controle (“housekeeping gene”).

#### Medida da atividade plasmática da renina

A atividade plasmática da renina foi medida por radioimunoensaio utilizando uma modificação do método de Haber.<sup>108</sup> O sangue foi retirado do tubo com EDTA, mantido em gelo, e realizada a separação das células através de centrifugação a 0° C. O plasma foi incubado durante 3 horas com reagentes (1,0 mM de dimercaptol e 3,4 mM de 8-hidroxiquinolina) a 37° C que inibem o ataque proteolítico à angiotensina I. Uma quota similar foi mantida a 0° C (controle) e 50 µl de cada amostra de plasma diluído (1:20) foi adicionado à mistura contendo reagentes que inibem a enzima de conversão da angiotensina e a angiotensinase, além da angiotensina I ligado a um marcador radioativo (<sup>125</sup>I). O produto da ação da renina sobre o seu substrato é a angiotensina I. A quantidade de angiotensina foi estimada pela comparação com as soluções padrão, sendo que cada amostra foi comparada ao seu próprio controle não incubado. Esse método fornece uma medida direta da atividade da renina ao quantificar a formação de angiotensina, tendo como vantagem a sua especificidade e reprodutibilidade.<sup>108</sup>

## Análise Estatística

Todos os dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (SE). Comparações para grupos múltiplos e análise multifatorial foram realizadas através de ANOVA de duas vias e por teste t Student não emparelhado para comparações entre os grupos experimental e controle. Considerou-se diferença significativa entre os grupos em estudo quando o valor de P foi menor que 0,05.

## Resultados

### Pressão arterial média e níveis de IL-6 no modelo RUPP

A pressão arterial média (PAM) foi significativamente maior em ratas submetidas ao modelo RUPP ( $138 \pm 1$  mmHg) comparada às ratas prenhes controles ( $104 \pm 1$  mmHg; Figura 4). Associado à elevação da PAM, os níveis séricos de IL-6 nos animais submetidos ao modelo RUPP encontravam-se três vezes acima dos níveis observados em ratas prenhes normais ( $104,6 \pm 28,6$  versus  $36,6 \pm 7,4$  pg/ml).

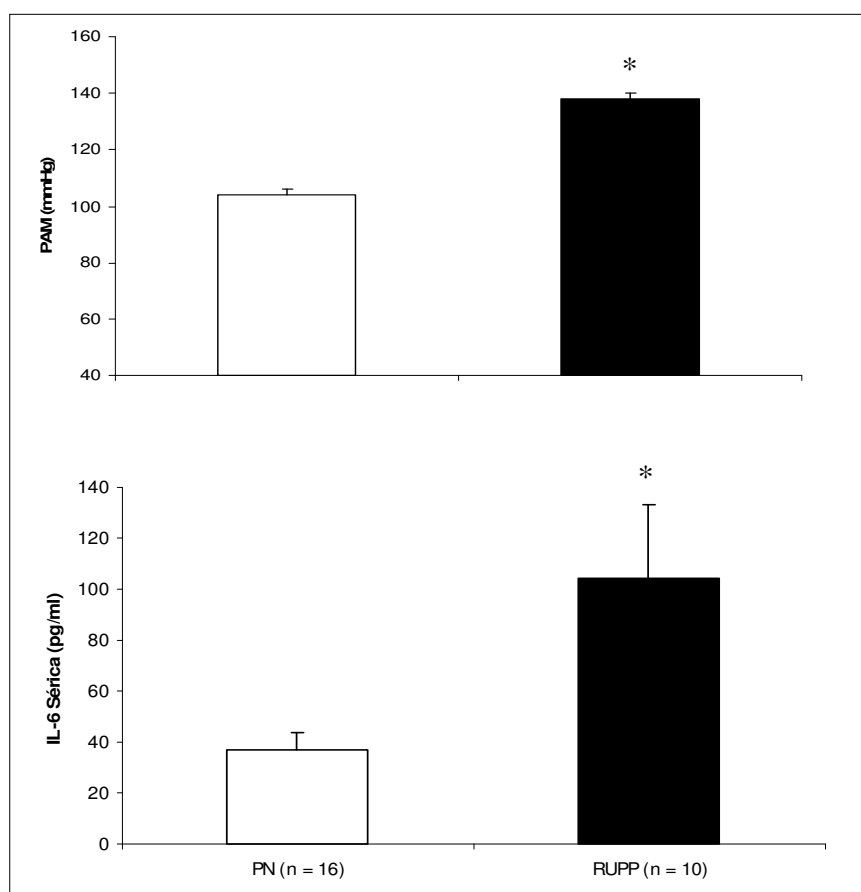


Figura 4. Pressão arterial média (PAM) e níveis séricos de IL-6 em ratas prenhes normais (PN) e ratas prenhes submetidas ao modelo RUPP. \* P < 0,05

versus ratas prenhes controles. Todos os dados são expressos em média  $\pm$  SE.

#### IL-6 sérica e PAM em ratas PN e tratadas com IL-6

A Figura 5 ilustra os níveis séricos de IL-6 em ratas prenhes controles e em ratas prenhes que receberam IL-6 durante 5 dias a 2,5 ng/dia, sendo que essas apresentaram elevação de 3 vezes dos níveis séricos de IL-6 em relação aos controles ( $55,5 \pm 5,5$  versus  $157,6 \pm 36$  pg/ml), o que é comparável aos níveis observados em animais submetidos ao modelo RUPP. A Figura 5 também ilustra as pressões arteriais médias em ratas prenhes controles e em ratas prenhes que receberam infusão de IL-6 por 5 dias a 2,5 ng/dia. A média das pressões foi de  $101 \pm 1$  mmHg em ratas prenhes controles. A pressão arterial em ratas prenhes que receberam IL-6 a 2,5 ng/dia atingiu a média de  $115 \pm 3$  mmHg, em torno de 15% acima das ratas controles.

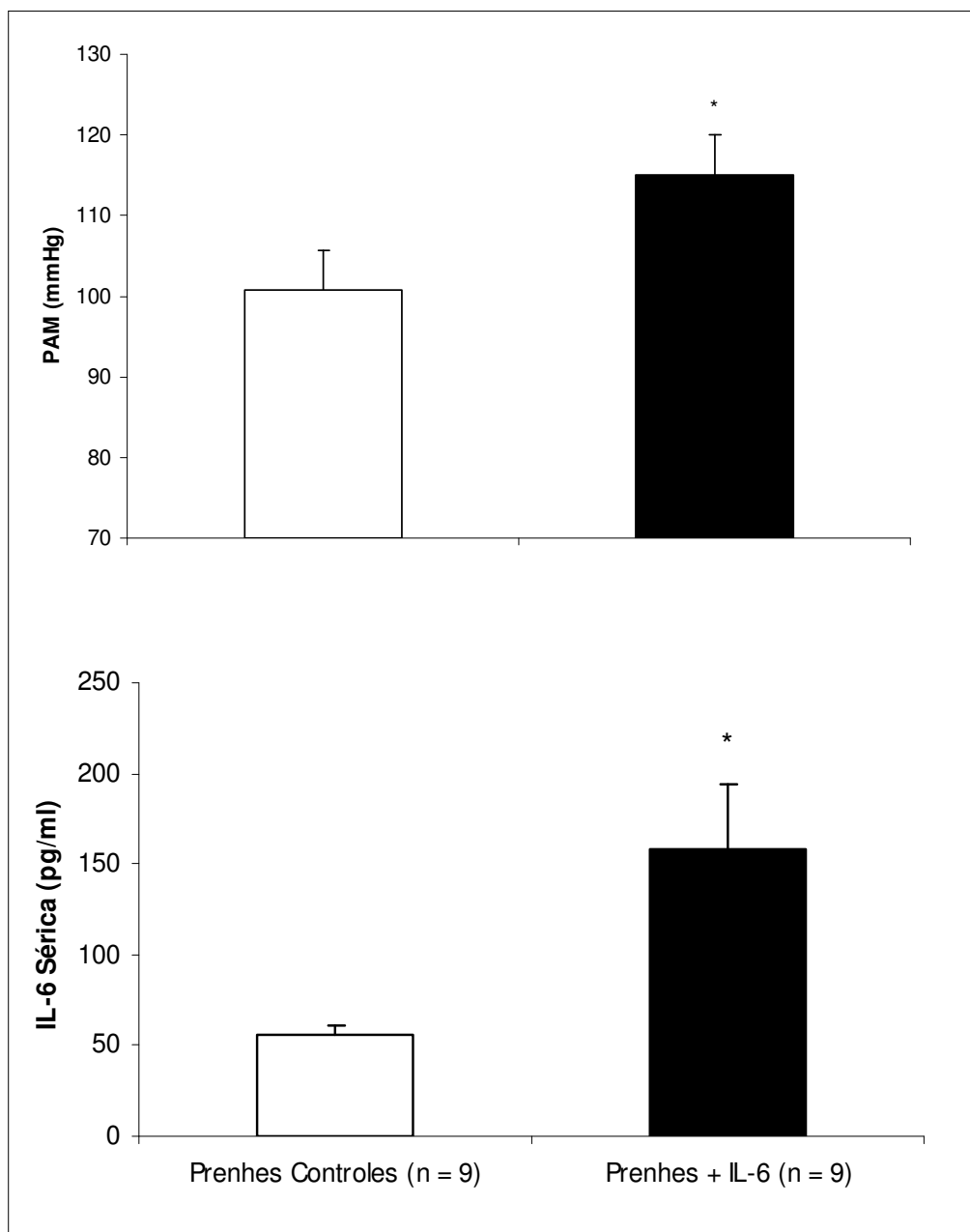


Figura 5. Pressão arterial média e concentração sérica de IL-6 em ratas prenhes controles e prenhes tratadas com IL-6 no dia 19 de gestação. \*  $P < 0,05$  versus ratas prenhes controles. Todos os dados são expressos em média  $\pm$  SE.

### Hemodinâmica renal em ratas prenhes controles e tratadas com IL-6

As diferenças nos parâmetros hemodinâmicos renais observados em ratas prenhes controles e ratas prenhes tratadas com 2,5 ng/dia de IL-6 durante 5 dias estão ilustradas na Figura 6. A resistência vascular renal foi significativamente maior em ratas prenhes tratadas com IL-6 na dose de 2,5 ng/dia quando comparada com ratas prenhes controles ( $15 \pm 0,9$  versus  $11 \pm 1,1$  mmHg/ml/min). O fluxo plasmático renal estava diminuído em ratas prenhes tratadas com IL-6 comparadas às prenhes controles ( $6,3 \pm 0,4$  versus  $9,6 \pm 1,2$  ml/min), assim como a taxa de filtração glomerular ( $1,9 \pm 0,1$  versus  $2,9 \pm 0,1$  ml/min).

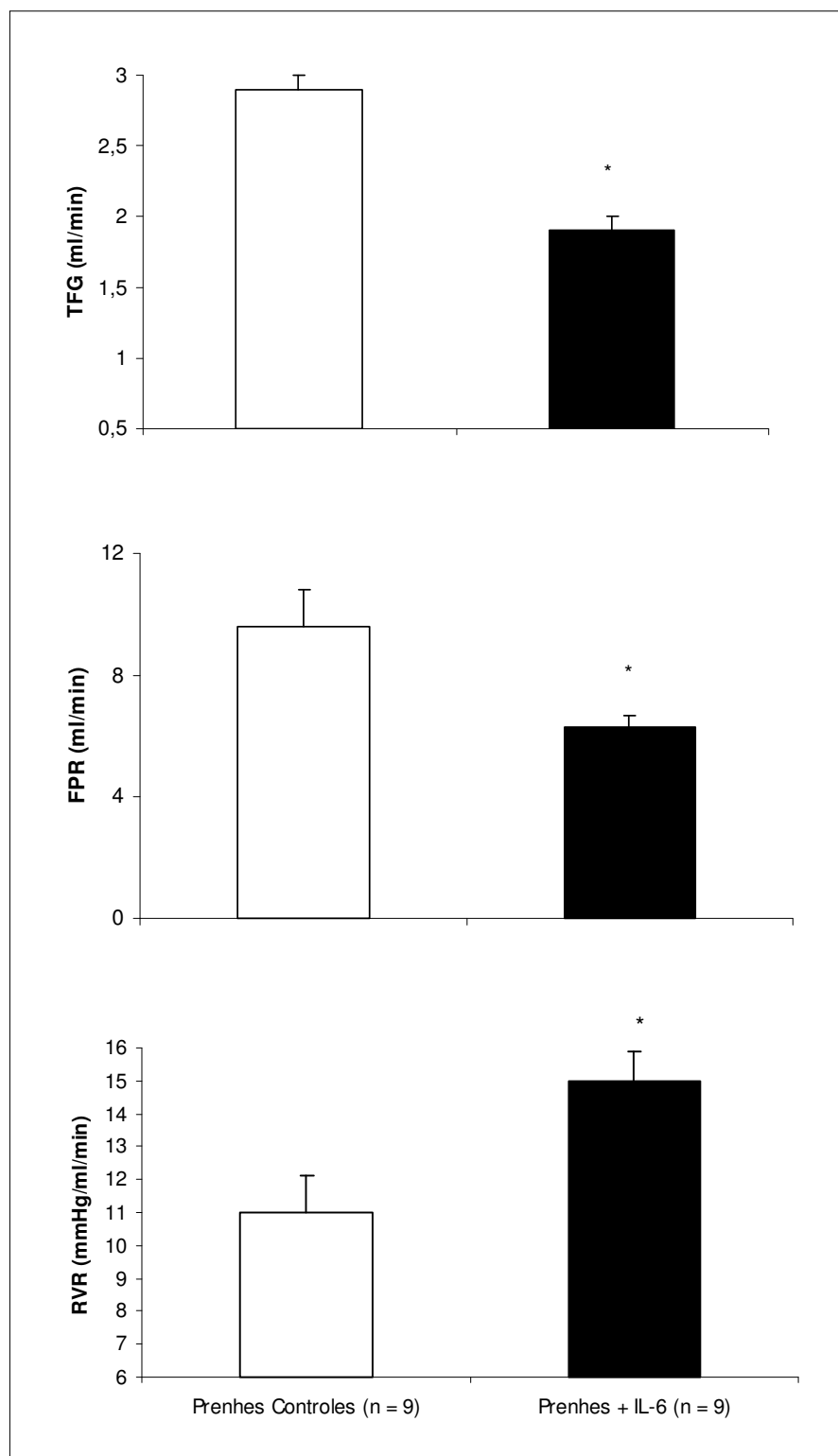


Figura 6. Taxa de filtração glomerular (TFG), fluxo plasmático renal (FPR) e resistência vascular renal (RVR) em ratas prenhes controles e prenhes

tratadas com IL-6 no décimo nono dia de gestação. \*  $P < 0,05$  versus ratas prenhes controles. Todos os dados são expressos em média  $\pm$  SE.

Efeito da IL-6 na pressão arterial e hemodinâmica renal em ratas virgens

Em contraste às ratas prenhes, o aumento em torno de duas vezes dos níveis séricos de IL-6 em ratas virgens (de  $59,1 \pm 7,2$  para  $103 \pm 31,5$  pg/ml) não teve efeito significativo sobre a pressão arterial média ( $136,8 \pm 4$  versus  $125,4 \pm 3,4$  mmHg; Figura 7).

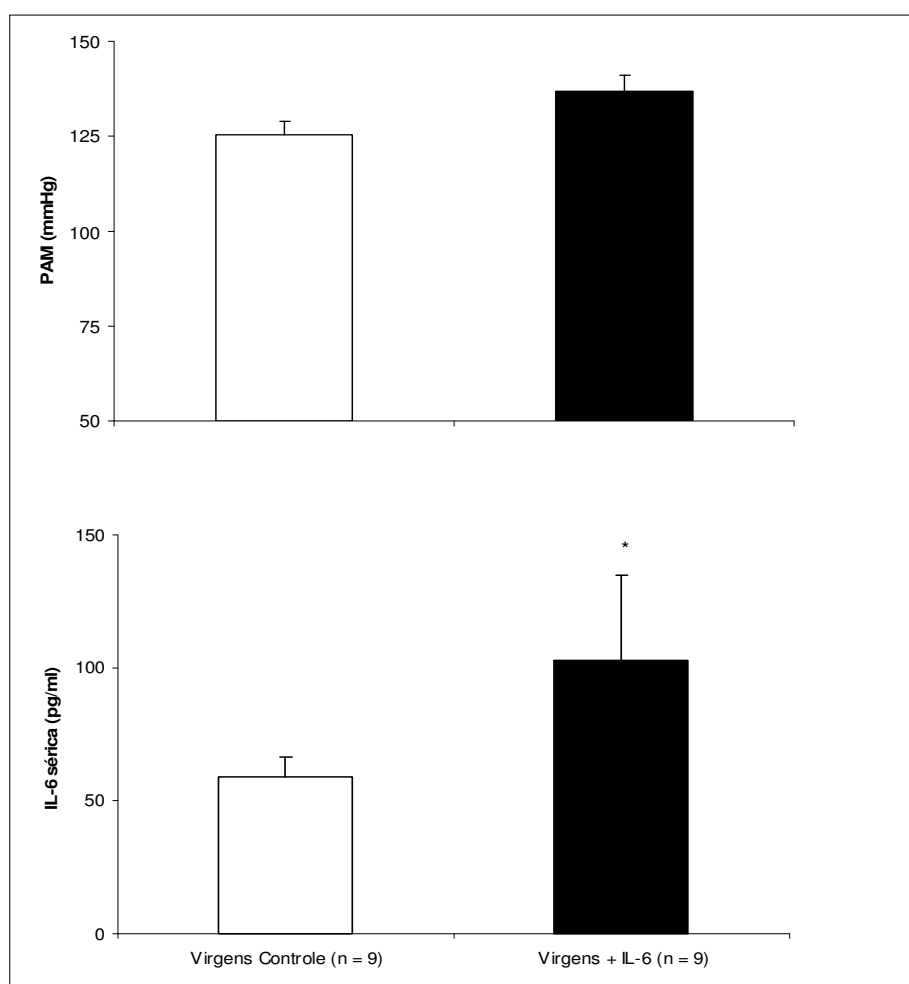


Figura 7. Pressão arterial média e concentração de IL-6 em ratas virgens controles e virgens tratadas com IL-6. \*  $P < 0,05$  versus ratas prenhes controles. Todos os dados são expressos em média  $\pm$  SE.



Além disso, não houve diferença significativa na RVR ( $11,2 \pm 0,6$  versus  $10,7 \pm 1,2$  mmHg/ml/min), no FPR ( $9,2 \pm 1,0$  versus  $8,9 \pm 0,7$  ml/min) e na TFG ( $2,2 \pm 0,1$  versus  $2,1 \pm 0,2$  ml/min) entre o grupo tratado com IL-6 e o grupo virgens controles (Figura 8).

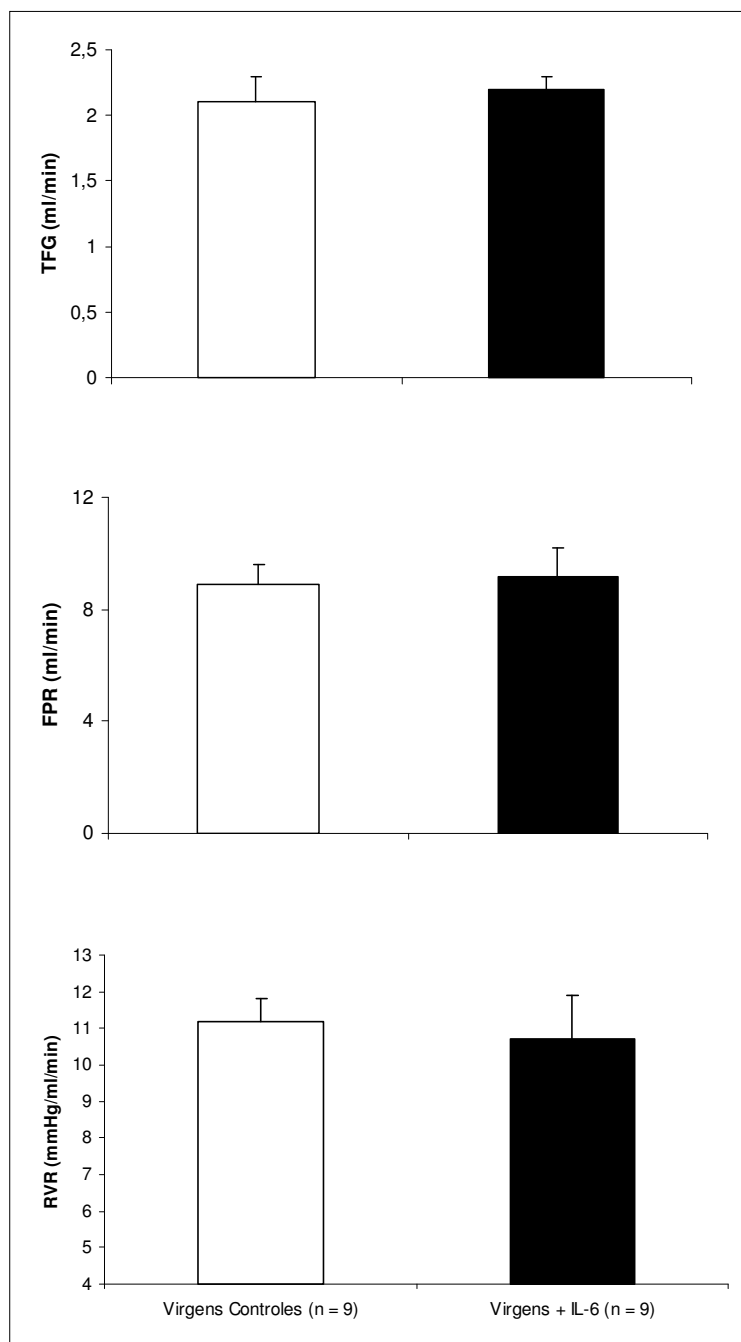


Figura 8. Taxa de filtração glomerular (TFG), fluxo plasmático renal (FPR) e resistência vascular renal (RVR) em ratas virgens controles e virgens tratadas com IL-6. Todos os dados são expressos em média  $\pm$  SE.

Efeitos da IL-6 sobre a endotelina plasmática, pré-pró endotelina renal e atividade plasmática da renina em ratas prenhes

Não houve diferenças significativas nos níveis plasmáticos de endotelina entre ratas prenhes normais e ratas prenhes tratadas com IL-6 ( $2,8 \pm 0,6$  versus  $2,1 \pm 0,3$  pg/ml; Figura 9). Ademais, os níveis de pré-pró endotelina renal não foram significativamente diferentes entre as ratas prenhes tratadas com IL-6 e prenhes controles (Figura 9).

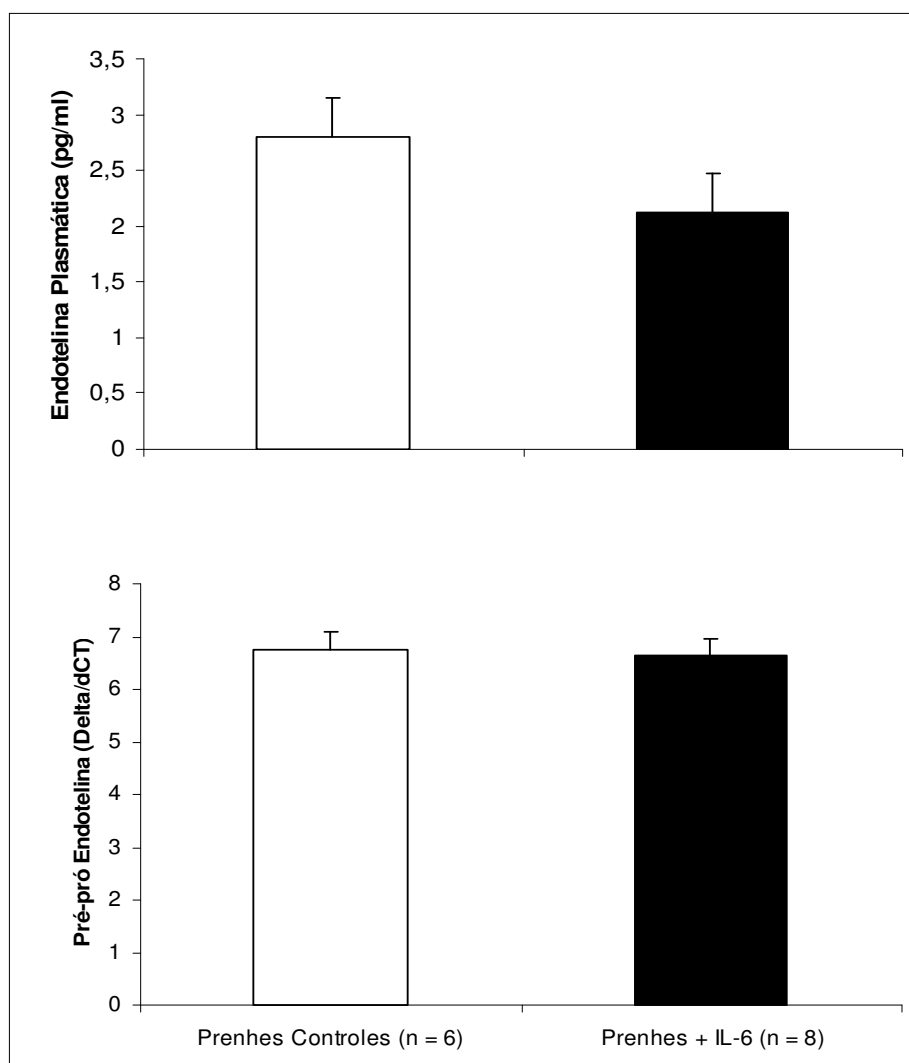


Figura 9. Níveis plasmáticos de endotelina em ratas prenhes controles e prenhes tratadas com IL-6. Expressão de pré-pró endotelina no tecido renal de

ratas prenhes controles e prenhes após infusão de IL-6. Não houve diferença significativa entre os grupos. Todos os dados são expressos como média  $\pm$  SE.

Em contraste, ratas prenhes tratadas com IL-6 tiveram níveis plasmáticos de atividade da renina significativamente maiores quando comparados com animais prenhes controles ( $13,1 \pm 1,5$  versus  $6,9 \pm 0,6$  ng/Al/ml/h; Figura 10).

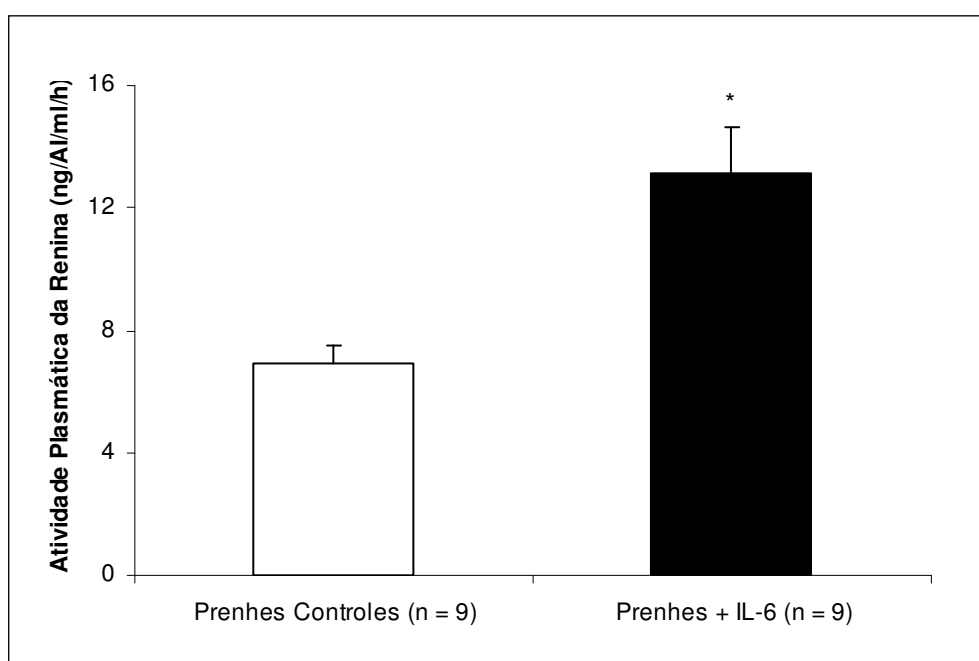


Figura 10. Atividade plasmática da renina em ratas prenhes controles e prenhes tratadas com IL-6. \*  $P < 0,05$  versus ratas prenhes controles. Todos os dados são expressos como média  $\pm$  SE.

## Discussão

Este estudo demonstra que a elevação da pressão arterial no modelo RUPP está associada a aumentos significativos nos níveis séricos de IL-6. Além disso, nós reportamos que a elevação crônica nos níveis séricos de interleucina-6, comparáveis àqueles observados em ratas submetidas ao modelo RUPP (em torno de três acima do valor observado nos animais controles) resulta em aumentos significativos da PA em ratas prenhes. O aumento na PA está associado ao aumento da resistência vascular renal, redução do fluxo plasmático renal e da taxa de filtração glomerular. O aumento na pressão arterial foi associado à ativação do sistema renina-angiotensina, como indicado pelo aumento da atividade da renina no plasma das ratas prenhes tratadas com IL-6. Esses resultados indicam que a IL-6 pode exercer um papel importante como mediador do aumento da PA e redução dos parâmetros hemodinâmicos renais observados no modelo de redução da pressão de perfusão uterina em ratas prenhes.

Neste experimento, foi realizada a infusão de IL-6 em ratas prenhes com o intuito de mimetizar os níveis séricos observados em ratas submetidas ao modelo RUPP. A IL-6 foi infundida na dose de 2,5 ng/dia durante 5 dias, sendo que os níveis plasmáticos de IL-6 foram medidos pelo método ELISA. A dose de 2,5 ng/dia aumentou as concentrações séricas de IL-6 para níveis que estavam pouco acima daqueles observados em ratas submetidas ao modelo RUPP.

A elevação nos níveis séricos de IL-6 resultou em aumento significativo da PA (em torno de 15%) comparados com ratas prenhes não tratadas, no

décimo nono dia de gestação. O aumento da PA em ratas tratadas com IL-6 foi associado a reduções de 30% a 40% no FPR e na TFG. A diminuição dos parâmetros hemodinâmicos renais em resposta à interleucina-6 é similar ao decréscimo previamente descrito em ratas submetidas ao modelo RUPP.<sup>69</sup> Entretanto, devido às concentrações séricas de IL-6 nas ratas tratadas estarem pouco acima daquelas observadas no modelo RUPP, pode ter havido uma supervalorização da relevância da IL-6 como mediador das reduções hemodinâmicas renais no modelo RUPP.

O mecanismo exato através do qual o aumento da IL-6 plasmática induz à elevação da PA durante a gestação não é conhecido. A interleucina-6 tem capacidade de causar disfunção endotelial, levando ao aumento da permeabilidade vascular,<sup>96</sup> inibindo a via de relaxamento mediada por óxido nítrico<sup>99</sup> e aumentando a reatividade vascular em vasos de ratas prenhes.<sup>96-99</sup> Foi reportado recentemente que o aumento da PA produzido pela elevação crônica nos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  em ratas prenhes está associado ao aumento significativo da produção local de endotelina no tecido renal. Além disso, foi demonstrado que o aumento da PA em resposta ao TNF- $\alpha$  é completamente abolido em ratas prenhes tratadas com o antagonista do receptor da endotelina A.<sup>107</sup> Também foi publicado previamente que a hipertensão em resposta à redução crônica da pressão de perfusão útero-placentária em ratas prenhes está associada a aumento significativo na expressão renal de pré-pró endotelina. Além disso, o bloqueio seletivo do receptor ETA virtualmente anula a hipertensão em resposta à redução crônica da perfusão útero-placentária.<sup>106</sup> Conjuntamente, esses achados sugerem que

a endotelina pode exercer um papel importante como mediador do aumento da pressão arterial induzida por citocinas em ratas prenhes.

Estudos prévios têm reportado um efeito da IL-6 em altas concentrações estimulando a síntese de endotelina por células epiteliais da via aérea,<sup>109</sup> células amnióticas,<sup>110</sup> células tumorais de tecido mamário<sup>111</sup> e células endoteliais.<sup>109-113</sup> Entretanto, no presente estudo, não foram observadas alterações significativas nos níveis plasmáticos de endotelina em ratas prenhes tratadas com IL-6 na dose que mimetiza os níveis séricos observados no modelo RUPP. Considerando que os níveis plasmáticos de endotelina podem não refletir a síntese local dessa citocina, também foi investigado a expressão renal do RNA mensageiro (mRNA) da pré-pró endotelina. Ao contrário dos achados no estudo com TNF- $\alpha$ ,<sup>69</sup> o aumento crônico de IL-6 no plasma de ratas prenhes não aumentou a expressão de mRNA da pré-pró endotelina no tecido renal. Esses dados sugerem que o aumento na PA e a redução da função renal em resposta à IL-6 em ratas prenhes podem não estar relacionados à síntese de endotelina no sistema renal.

Outros sistemas fundamentais no controle da pressão arterial interagem com as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$ .<sup>91-94</sup> Apesar de haver evidências demonstrando através de estudos experimentais que as citocinas pró-inflamatórias podem ativar o sistema nervoso simpático<sup>95</sup> e que a angiotensina é capaz de induzir a síntese de IL-6,<sup>91,92</sup> não está claro se citocinas como a IL-6 ativam o sistema renina-angiotensina. Foi publicado previamente que a atividade plasmática da renina não está aumentada em ratas submetidas ao modelo RUPP.<sup>105</sup> Entretanto, no presente estudo, constatou-se que as ratas prenhes tratadas com IL-6 apresentaram níveis de

atividade plasmática da renina significativamente maiores que aqueles encontrados em animais prenhes controles. O efeito da IL-6 na atividade plasmática da renina pode estar associado à vasoconstrição e redução da natriurese de pressão, levando ao aumento da pressão arterial.<sup>114</sup> Porém, o grau de contribuição do sistema renina-angiotensina como mediador in vivo dos efeitos da IL-6 durante a gestação não é conhecido, permanecendo como uma relevante área a ser investigada.

A resposta hemodinâmica renal e da pressão arterial à IL-6 foram observadas exclusivamente em ratas prenhes. A administração de IL-6 em ratas virgens não gerou os mesmos efeitos sobre a pressão arterial ou sobre os parâmetros hemodinâmicos renais. Estudos prévios reportaram aumento da suscetibilidade aos lipopolissacarídeos e ao TNF- $\alpha$  sobre os efeitos renais e cardiovasculares induzidos durante a gestação.<sup>64,69</sup> Faas et al<sup>64</sup> demonstraram que a administração única de baixas doses de lipopolissacarídeos aumenta a pressão arterial e a excreção de albumina em ratas prenhes, o que não ocorre com ratas virgens. Lamarca et al<sup>69</sup> também publicaram recentemente que a elevação crônica dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  induz aumento da PA e redução da função renal em ratas prenhes, não havendo efeitos significativos em ratas virgens. Apesar de o mecanismo exato para o aumento da sensibilidade às citocinas inflamatórias durante a gestação ser desconhecido, ele pode estar relacionado aos níveis circulatórios dos hormônios sexuais. Os altos níveis de progesterona e 17- $\beta$  estradiol encontrados durante a gestação de ratas, faz com que esses esteróides constituam potenciais mediadores. De acordo com essa hipótese, estão os achados de Cid et al<sup>115</sup> demonstrando a capacidade da progesterona e do estrógeno em aumentar o estímulo



leucocitário para expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais induzido por TNF- $\alpha$ . Apesar de esses achados apontarem para um potencial papel dos hormônios sexuais no aumento da resposta endotelial às citocinas inflamatórias, a importância do estrogênio e da progesterona no aumento da ativação endotelial e da resposta hipertensiva às citocinas permanece ignorada.

Os investigadores, em sua maioria, descreveram aumento significativo nos níveis plasmáticos de IL-6 em mulheres com PE.<sup>49,55,56,60,61,62,90,101</sup> A fonte de IL-6 na PE em resposta à isquemia placentária é incerta.<sup>54,90,101</sup> Estudos prévios *in vitro* têm implicado os citotroblastos placentários como potenciais sítios para a síntese de citocinas na PE.<sup>54,61,90,115</sup> O fato de a redução da perfusão uterina em ratas prenhes aumentar os níveis séricos de IL-6 também sugere que a placenta pode ser o local de origem para a produção dessa citocina. Entretanto, estudos recentes em humanos sugerem que outras fontes, além da placenta, contribuem para o aumento das concentrações das citocinas encontradas na circulação de gestantes com PE.<sup>54,61,90</sup> A expressão protéica e os níveis de mRNA da IL-6 são comparáveis em placentas a termo ou pré-termo com ou sem pré-eclâmpsia.<sup>61</sup> Além disso, a produção de IL-6 pelo tecido placentário coletado de gestantes com PE, quando em meio de cultura, está diminuída se comparada ao mesmo tecido de placentas colhido de gestantes normais a termo.<sup>55,61</sup> Portanto, apesar de os níveis de IL-6 estarem aumentados na circulação de mulheres com PE, a origem da citocina pode não ser placentária, mas provinda de outras fontes além da placenta. Potenciais produtores de IL-6 podem ser leucócitos ativados ou o próprio endotélio materno, que têm capacidade de produzir IL-6 quando exposto a estímulos,

como o exercido pelo TNF- $\alpha$ .<sup>101</sup> Apesar de o TNF- $\alpha$  ter sido descrito como aumentado em gestantes com PE<sup>54,55</sup> e em ratas submetidas ao modelo RUPP,<sup>69</sup> a importância relativa desse fator como estimulador da produção de IL-6 em resposta à diminuição da pressão de perfusão uterina precisa ser determinada.

### Perspectivas

Apesar de ser uma das principais causas de morbidade e de mortalidade tanto materna quanto fetal, os mecanismos fisiopatológicos da elevação da pressão arterial na PE não estão completamente elucidados.<sup>8,116</sup> O aumento nos níveis circulatórios de vários fatores, tais como as citocinas inflamatórias (incluindo a IL-6) podem servir como mediadores da ativação e disfunção endotelial materna na PE. Neste estudo, foi relatado que a elevação na PA em ratas submetidas ao modelo RUPP está associada também ao aumento dos níveis séricos de IL-6. Além disso, foi descrito que a elevação crônica dos níveis séricos de IL-6 em ratas prenhes, atingindo níveis comparáveis àqueles encontrados em ratas submetidas ao modelo RUPP, resulta em aumento significativo da pressão arterial. A elevação da PA é acompanhada pelo aumento da resistência vascular renal e redução do fluxo plasmático renal e da taxa de filtração glomerular. Esses resultados indicam que a interleucina-6 pode participar como mediador da hipertensão e das alterações dos parâmetros hemodinâmicos renais observados no modelo de redução da perfusão uterina em ratas prenhes.

Apesar de ter sido demonstrado que a IL-6 pode exercer um papel importante como mediador da elevação da PA em resposta à redução crônica da pressão de perfusão uterina, a relevância da IL-6 e de outras citocinas inflamatórias como mediadores das alterações renais e cardiovasculares durante a PE em humanos permanece desconhecida. Além disso, não é sabido se drogas que inibem as ações dessas citocinas podem ser benéficas para gestantes com alto risco de desenvolver pré-eclâmpsia. Essas questões extremamente relevantes não serão respondidas até que ensaios clínicos controlados investigando inibidores específicos das citocinas forem realizados em gestantes com pré-eclâmpsia.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O grupo do Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas e Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da PUCRS está empenhado em entender os distúrbios hipertensivos da gestação. O foco de investigação tem sido o estudo dos distúrbios hipertensivos gestacionais e aspectos da via L-arginina / óxido nítrico,<sup>34,35</sup> disfunção endotelial, polimorfismo genético<sup>117</sup> e marcadores de doença.

A presente tese inaugurou uma cooperação científica entre dois grupos com interesses em comum, a PUCRS e a UMC. Os estudos que o autor apresenta abrem espaço para o grupo do Laboratório de Nefrologia desenvolver projetos envolvendo as doenças hipertensivas gestacionais em modelos animais, não disponíveis até então. Introduz, também, no grupo do Dr. Granger a possibilidade de desenvolver estudos em humanos, o que já foi dado início.<sup>118</sup>

As doenças hipertensivas gestacionais, especialmente a pré-eclâmpsia, permanecem entre as principais causas de mortalidade tanto materna quanto fetal, mesmo em países desenvolvidos. Apesar dos investimentos em pesquisas realizados nas últimas décadas, a etiologia da PE é desconhecida e a sua fisiopatologia ainda não está completamente elucidada.

Na medida em que o conhecimento aumenta, observa-se que se trata de uma doença com a participação de múltiplos fatores, tais como o endotélio materno, a carga genética dos pais, as doenças sistêmicas prévias da mãe e o ambiente.

Dentre as áreas de investigação abordadas para o entendimento da doença, encontram-se as adaptações hemodinâmicas renais e sistêmicas fisiológicas típicas da gestação. Está descrita a participação do óxido nítrico como indutor e mantenedor dessas modificações, mesmo havendo controvérsias sobre o aumento da sua produção no período gestacional. Estudos prévios realizados no Laboratório de Nefrologia demonstraram que existe aumento do transporte do precursor do NO, a L-arginina, ao longo da gestação normal e que a via da L-arginina / óxido nítrico sofre alterações nas pacientes com PE.

O Estudo 1 da presente tese visava a investigar os mediadores das adaptações hemodinâmicas renais ocorridas durante a gestação normal, mais especificamente o papel da isoforma endotelial da enzima produtora de óxido nítrico. Estudos como os referidos são de difícil realização em humanos devido às limitações éticas de manipulação e processamento de materiais, o que motivou a investigação em animais. Experimentos realizados envolvendo as isoformas induzível e neuronal utilizaram inibidores considerados específicos para as mesmas. Estudos publicados utilizando a L-NIO se referem à droga como o inibidor mais potente<sup>86,87</sup> ou como inibidor seletivo<sup>78-84</sup> da eNOS, o que encorajou a sua utilização para testar os efeitos sobre os parâmetros hemodinâmicos renais. Porém, o uso da L-NIO com esse fim não é visto com unanimidade, o que se constitui uma das principais limitações do estudo. Mesmo assim, considerando os dados encontrados, fica sugerido que a eNOS pode estar envolvida nas alterações hemodinâmicas renais observadas durante a gestação normal em ratas.

A redução do fluxo placentário secundária à remodelação inadequada das arteríolas espiraladas tem sido admitida como a alteração inicial que desencadeia a síndrome de pré-eclâmpsia. Por outro lado, não há consenso sobre o fator que transmite para a circulação materna sistêmica as alterações endoteliais encontradas na patologia. Parece cada vez mais claro que não se trata de um, mas de vários fatores. Dentre esses fatores, é crescente o número de publicações sugerindo a participação de mediadores inflamatórios na fisiopatogenia da pré-eclâmpsia. A presença de vários fatores envolvidos, assim como as limitações éticas impostas na investigação da doença faz com que sejam utilizados modelos animais. Todos os modelos experimentais descritos até o momento tentam reproduzir o maior número possível de características da doença em humanos, mas nenhum consegue fazê-lo plenamente, detendo-se invariavelmente em apenas um aspecto. Assim, optou-se pela utilização do modelo de redução da pressão de perfusão uterina por se acreditar que existem evidências suficientes na literatura descrevendo diminuição da perfusão placentária na PE. Além disso, existe amplo conhecimento da técnica documentado nas publicações do Departamento de Fisiologia da UMC.

Esse modelo corroborou a participação de citocinas pró-inflamatórias como mediadores da hipertensão arterial encontrada no modelo RUPP, como o fator de necrose tumoral alfa.<sup>69,70</sup> O Estudo 2 situa-se dentro da linha de pesquisa investigando a relevância de outros mediadores inflamatórios, especificamente a interleucina-6, que poderiam ter participação no aumento da pressão arterial encontrado na doença e que estão relacionados ao próprio fator de necrose tumoral alfa. No presente estudo, sugere-se que a

interleucina-6 também pode exercer um papel importante como mediador no aumento da pressão arterial. Esses achados apóiam a idéia que esses mediadores podem ser relevantes no processo envolvendo a isquemia placentária e a disfunção endotelial sistêmica.

Estudos que utilizam modelos experimentais em ratos possuem limitações. Primeiramente, não são animais mais avançados na escala evolutiva. Além disso, especificamente no caso do Estudo 1, observou-se a dificuldade de isolar um sistema ou até mesmo uma isoforma da enzima produtora de óxido nítrico de maneira específica, sem afetar outras isoformas. A literatura, porém, sugere que a droga possa ser usada como inibidor específico. No presente estudo, considerou-se a droga como um inibidor preferencial da eNOS, ou seja, com maior afinidade por essa isoforma. Ademais, no Estudo 2, observamos que o modelo de redução da pressão de perfusão uterina leva muitas vezes à reabsorção dos fetos, obrigando a retirada da análise aqueles animais em que ocorre esse processo, conforme adotado neste experimento. Esse modelo induz o aumento da excreção de proteína na urina, porém não de maneira tão importante quanto o encontrado em humanos. Também não está descrito que esses animais evoluam para eclâmpsia se não houver interrupção da gestação, o que seria uma forma mais grave da doença e, provavelmente, um modelo mais confiável. Além disso, ao dosarmos os níveis de IL-6, por se tratar de um mediador inflamatório, corremos o risco de observar a sua produção induzida pela manipulação e estresse cirúrgico, o que não acontece em condições usuais. No Estudo 2, foi realizada a cirurgia “sham” nos grupos controles, ou seja, apenas a manipulação cirúrgica sem a infusão da droga a fim de evitar o efeito do estresse induzido durante e após a cirurgia.

Mesmo que os achados não sejam aplicáveis diretamente para as condições encontradas em humanos, estudos como os descritos na presente tese podem estar colaborando na esfera básica da pesquisa para a construção do conhecimento necessário para futuras abordagens da doença. Assim, se entende que é preciso continuar investigando tanto as alterações fisiológicas da gestação quanto o envolvimento específico de citocinas no processo patológico, especialmente a interleucina-6. Futuramente, depois de esclarecido alguns aspectos cruciais envolvendo a etiologia e a fisiopatologia dessa patologia, será possível abordar a doença de maneira mais clara e com alternativas terapêuticas mais eficazes que as empregadas atualmente.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. World Health Report 2005 - make every mother and child count. 2005 [capturado 2006 Jul 4] Disponível em: <http://www.who.int/whr/2005/en/index.html>.
2. Galão A. Transporte eritrocitário de L-arginina na gestação e período pós-parto [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2000.
3. Ramos JGL, Martins-Costa S, Vettorazzi-Stuczynski J, Brietzke E. Morte materna em hospital terciário do Rio Grande do Sul – Brasil: um estudo de 20 anos. Rev Bras Ginecol Obstet 2003;25(6):431-6.
4. Lain KY, Roberts JM. Contemporary concepts of the pathogenesis and management of preeclampsia. JAMA 2002;287(24):3183-6.
5. Walker JJ. Pre-eclampsia. Lancet 2000;356(9237):1260-5.
6. Roberts JM, Pearson GD, Cutler JA, Lindheimer MD. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. Hypertens Pregnancy 2003;22(2):109-27.
7. Gaio DS, Schmidt MI, Duncan BB, Nucci LB, Matos MC, Branchtein L. Hypertensive disorders in pregnancy: frequency and associated factors in a cohort of Brazilian women. Hypertens Pregnancy 2001;20(3):269-81.
8. Roberts JM, Lain KY. Recent insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. Placenta 2002;23(5):359-72.
9. Esplin MS, Fausett MB, Fraser A, Kerber R, Mineau G, Carrillo J, Varner MW. Paternal and maternal components of the predisposition to pre-eclâmpsia. N Engl J Med 2001;344(12):867-72.

10. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005;308(5728):1592-4.
11. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005;365(9461):785-99.
12. Roberts JM, Gammill HS. Preeclampsia: recent insights. *Hypertension* 2005;46(6):1243-49.
13. Shembrey MA, Noble AD. An instructive case of abdominal pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1995;35(2):220-1.
14. Roberts JM. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;16(1):5-15.
15. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. *J Clin Invest* 1997;99(9):2152-64.
16. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 1997;277(5332):1669-72.
17. King A, Hiby SE, Gardner L, Joseph S, Bowen JM, Verma S, Burrows TD, Loke YW. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors – a review. *Placenta* 2000;Suppl A:S81-5.
18. DiFederico E, Genbacev O, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *Am J Pathol* 1999;155(1):293-301.
19. Knight M, Redman CW, Linton EA, Sargent IL. Shedding of syncytiotrophoblasts microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105(6):632-40.

20. Khalil RA, Granger JP. Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;283(1): R29-45.

21. Schobel HP, Fischer T, Heuszer K, Geiger H, Schmieder RE. Preeclampsia – a state of sympathetic overactivity. *N Eng J Med* 1996;335(20):1480-5.

22. Roberts JM, Redman CW. Pre-eclampsia: more than pregnant-induced hypertension. *Lancet* 1993;341(8858):1447-51.

23. Gaber LW, Spargo BH, Lindheimer MD. Renal pathology in pre-eclampsia. In: Lindheimer MD, Davison JM, editores. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology*. Vol 8, n 2. London: Baillière Tindall; 1994. p 443-68.

24. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001;38(3 Pt 2):718-22.

25. Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, Abramson SB. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclâmpsia. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171(4):944-8.

26. Sladek SM, Magness RR, Conrad KP. Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol* 1997;272(2 Pt 2):R441-63.

27. Baylis C, Suto T, Conrad K. Importance of nitric oxide in control of systemic and renal hemodynamics during normal pregnancy: studies in the rat and implications for preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 1996;15(2):147-69.

28. Conrad KP, Joffe GM, Kruszyna H, Kruszyna R, Rochelle LG, Smith RP, Chavez JE, Mosher MD. Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB J* 1993;7(6):566-71.

29. Molnar M, Souto T, Toth 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(5 Pt 1):1458-66.

30. Pinheiro da Costa BE, Ogando P, Poli de Figueiredo CE. Lipídios plasmáticos e óxido nítrico na síndrome de pré-eclâmpsia [abstract]. In: XXI Congresso Brasileiro de Nefrologia; 2002 Set 14-18; Brasília. *J Bras Nefrol* 2002;24(Supl II):69. Abstract nr PO-053.

31. Pinheiro da Costa BE, Ogando P, Acauan B, Poli de Figueiredo CE. Avaliação dos metabólitos plasmáticos do óxido nítrico em gestantes primigestas normais e com pré-eclâmpsia [abstract]. In: XXI Congresso Brasileiro de Nefrologia; 2002 Set 14-18; Brasília. *J Bras Nefrol* 2002;24(Supl II):92. Abstract PO-147.

32. Poli de Figueiredo CE, Pinheiro da Costa BE, Ogando P, Acauan B. Nitric oxide metabolites in preeclampsia and normal pregnancy. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:145.

33. Lowe DT. Nitric oxide dysfunction in the pathophysiology of preeclampsia. *Nitric Oxide* 2000;4(4):441-58.

34. Galão AO, Costa BE, d'Avila DO, Poli de Figueiredo CE. L-arginine erythrocyte transport increases during pregnancy and immediately postpartum. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191(2):572-5.

35. da Costa BP, Steibel JP, Antonello IC, Guimarães JA, Poli de Figueiredo CE. L-arginine erythrocyte transport in normal pregnant and preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190(2):468-71.

36. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. *Am J Kidney Dis* 1994;24(1):112-29.

37. Alexander BT, Miller MT, Kassab S, Novak J, Reckelhoff J, Kruckeberg WC, Granger JP. Differential expression of renal nitric oxide synthase isoforms during pregnancy in rats. *Hypertension* 1999;33(1 pt 2):435-9.

38. Novak J, Rajakumar A, Miles TM, Conrad KP. Nitric oxide synthase isoforms in the rat kidney during pregnancy. *J Soc Gynecol Investig* 2004;11(5):280-8.

39. Abram SR, Alexander BT, Bennett WA, Granger JP. Role of neuronal nitric oxide synthase in mediating renal hemodynamic changes during pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281(5):R1390-3.

40. Alexander BT, Cockrell K, Cline FD, Granger JP. Inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates renal hemodynamics during pregnancy. *Hypertension* 2002;39(2 Pt 2):586-90.

41. Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(11):5212-16.

42. Pinheiro da Costa BE, Scocco C, Poli de Figueiredo CE, Guimarães JA. Increased serum phosphodiesterase activity in women with pre-eclampsia. *BJOG* 2006;113(5):577-9.

43. Mills JL, DerSimonian R, Raymond E, Morrow JD, Roberts LJ, Clemens JD, Hauth JC, Catalano P, Sibai B, Curet LB, Levine RJ. Prostacyclin and thromboxane changes predating clinical onset of preeclampsia: a multicenter prospective study. *JAMA* 1999;282(4):356-62.

44. Bussen SS, Sütterlin MW, Steck T. Plasma renin activity and aldosterone serum concentration are decreased in severe preeclampsia but not in the HELLP-syndrome. *Acta Obstetrica Gynecol Scand* 1998;77(6):609-13.

45. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in pre-eclampsia. *J Clin Invest* 2003;111(5):649-58.

46. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi A. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* 2006;355(10):992-1005.

47. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai JI, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillmann IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Selke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 2006;12(6):642-49.

48. Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* 2001;357(9249):53-6.

49. Vince GS, Starkey PM, Austgulen R, Kwiatkowski D, Redman CW. Interleukin-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1995;102(1):20-25.

50. Chappell LC, Seed PT, Briley AL, Kelly FJ, Lee R, Hunt BJ, Parmar K, Bewley J, 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;354(9181):810-6.

51. Poston L, Briley AL, Seed PT, Kelly FJ, Shennan AH. Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2006(9517);367:1145-54.

52. Rumbold AR, Crowther CA, Haslam RR, Dekker GA, Robinson JS; ACTS Study Group. Vitamins C and E and the risks of preeclampsia and perinatal complications. *N Engl J Med* 2006;354(17):1796-806.

53. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180(2 Pt 1):499-506.

54. Conrad KP, Miles TM, Benyo DF. Circulating levels of immunoreactive cytokines in women with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1998;40(2):102-11.

55. Kupferminc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Rehnberg KA, Socol ML. Tumor necrosis factor-alpha is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170(6):1752-7.

56. Greer IA, Lyall F, Perera T, Boswell F, Macara LM. Increased concentrations of cytokines interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in

plasma of women with preeclampsia: a mechanism for endothelial dysfunction? *Obstet Gynecol* 1994;84(6):937-40.

57. Jonsson Y, Ruber M, Matthiesen L, Berg G, Nieminen K, Sharma S, Ernerudh J, Ekerfelt C. Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies *J Reprod Immunol* 2006;70(1-2):83-91.

58. Ellis J, Wennerholm UB, Bengtsson A, Lilja H, Pettersson A, Sultan B, Wennergren M, Hagberg H. Levels of dimethylarginines and cytokines in mild and severe preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;80(7):602-8.

59. Haeger M, Unander M, Andersson B, Tarkowski A, Arnestad JP, Bengtsson A. Increased release of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in women with the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996;75(8):695-701.

60. Silver RM, Schwinzer B, McGregor JA. Interleukin-6 levels in amniotic fluid in normal and abnormal pregnancies: preeclampsia, small-for-gestational-age fetus, and premature labor. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169(5):1001-5.

61. Kauma SW, Wang Y, Walsh SW. Preeclampsia is associated with decreased placental interleukin-6 production. *J Soc Gynecol Investig* 1995;2(4):614-7.

62. Al-Othman S, Omu AE, Diejomaoh FM, Al-Yatama M, Al-Qattan F. Differential levels of interleukin 6 in maternal and cord sera and placenta in women with pre-eclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2001;52(1):60-5.

63. Podjarny E, Losonczy G, Baylis C. Animal models of preeclampsia. *Semin Nephrol* 2004;24(6): 596-606.



64. Faas MM, Schuiling GA, Baller JF, Visscher CA, Bakker WW. A new animal model for human pré-eclâmpsia: ultra-low-dose endotoxin infusion in pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171(1):158-64.

65. Zenclussen AC, Fest S, Joachim R, Klapp BF, Arck PC. Introducing a mouse model for pre-eclampsia: adoptive transfer of activated Th1 cells leads to pre-eclampsia-like symptoms exclusively in pregnant mice. *Eur J Immunol* 2004; 34(2):377-87.

66. Davisson RL, Hoffmann DS, Butz GM, Aldape G, Schlager G, Merrill DC, Sethi S, Weiss RM, Bates JN. Discovery of a spontaneous genetic mouse model of preeclampsia. *Hypertension* 2002;39(2 Pt 2):337-42.

67. Eder DJ, McDonald MT. A role for brain angiotensin II in experimental pregnancy-induced hypertension in laboratory rats. *Clin Exp Hypertens B* 1987;B6:431-55.

68. Alexander BT, Kassab SE, Miller MT, Abram SR, Reckelhoff JF, Bennett WA, Granger JP. Reduced uterine perfusion pressure during pregnancy in the rat is associated with increases in arterial pressure and changes in renal nitric oxide. *Hypertension* 2001;37(4):1191-5.

69. LaMarca BB, Bennett WA, Alexander BT, Cockrell K, Granger JP. Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of tumor necrosis factor-alpha. *Hypertension* 2005;46(4):1022-5.

70. Granger JP. Inflammatory cytokines, vascular function, and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286(6):R989-90.

71. Spector, Nelson. Manual para Redação de Teses, Dissertações e Projetos de Pesquisa. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 117 p.

72. Davison JM, Dunlop W. Renal hemodynamics and tubular function in normal human pregnancy. *Kidney Int* 1980;18(2):152-61.

73. Conrad KP. Mechanisms of renal vasodilation and hyperfiltration during pregnancy. *J Soc Gynecol Investig* 2004;11(7):438-48.

74. Baylis C. Glomerular filtration and volume regulation in gravid animal models. In: Lindheimer MD, Davison JM, editores. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynecology*. 2<sup>nd</sup> ed. London: Baillière Tindall; 1994. p 235-64.

75. Kassab S, Miller MT, Hester R, Novak J, Granger JP. Systemic hemodynamics and regional blood flow during chronic nitric oxide synthesis inhibition in pregnant rats. *Hypertension* 1998;31(1 Pt 2): 315-20.

76. Danielson LA, Conrad KP. Acute blockade of nitric oxide synthase inhibits renal vasodilation and hyperfiltration during pregnancy in chronically instrumented conscious rats. *J Clin Invest* 1995;96(1):482-90.

77. Weiner CP, Knowles RG, Moncada S. Induction of nitric oxide synthases early in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171(3):838-43.

78. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990;101(3):746-52.

79. Jiang MH, Kaku T, Hada J, Hayashi Y. Different effects of eNOS and nNOS inhibition on transient forebrain ischemia. *Brain Res* 2002;946(1):139-47.

80. Li S, Ohgami Y, Dai Y, Quock RM. Antagonism of nitrous oxide-induced anxiolytic-like behavior in the mouse light/dark exploration procedure by pharmacologic disruption of endogenous nitric oxide function. *Psychopharmacology (Berl)* 2003;166(4):366-72.

81. Ishikawa M, Quock R. Role of nitric-oxide synthase isoforms in nitrous oxide antinociception in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306(2):484-9.

82. Banwait KS, Rattan S. Role of nitric oxide in beta3-adrenoceptor activation on basal tone of internal anal sphincter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285(3):G547-55.

83. Xu Z, Park SS, Mueller RA, Bagnell RC, Patterson C, Boysen PG. Adenosine produces nitric oxide and prevents mitochondrial oxidant damage in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2005;65(4): 803-12.

84. Ishide T, Preuss CV, Maher TJ, Ally A. Neurochemistry within ventrolateral medulla and cardiovascular effects during static exercise following eNOS antagonism. *Neurosci Res* 2005;52(1): 21-30.

85. Marcel de Vries PA, Navis G, de Boer E, de Jong PE, de Zeeuw D. A method for accurate measurement of GFR in conscious, spontaneously voiding rats. *Kidney Int* 1997;52(1):244-7.

86. McCall TB, Feelisch M, Palmer RM, Moncada S. Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. *Br J Pharmacol* 1991;102(1): 234-8.

87. Wolff DJ, Lubeskie A, Gauld DS, Neulander MJ. Inactivation of nitric oxide synthases and cellular nitric oxide formation by N6-iminoethyl-L-lysine-L-ornithine. *Eur J Pharmacol* 1998;350(2-3):325-34.

88. Shesely EG, Gilbert C, Granderson G, Carretero CD, Carretero OA, Beierwaltes WH. Nitric oxide synthase gene knockout mice do not become hypertensive during pregnancy. *Am J Obstet Gyneacol* 2001;185(5): 1198-203.

89. Ortiz PA, Garvin JL. Cardiovascular and renal control in NOS-deficient mouse models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284(3):R628-38.

90. Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(6):2505-12.

91. Funakoshi Y, Ichiki T, Ito K, Takeshita A. Induction of interleukin-6 expression by angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1999;34(1):118-25.

92. Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res* 1999;84(6):695-703.

93. Lee DL, Sturgis LC, Labazi H, Osborne JB Jr, Fleming C, Pollock JS, Manhiani M, Imig JD, Brands MW. Angiotensin II hypertension is attenuated in interleukin-6 knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290(3):H935-40.

94. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, Egido J. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int Suppl* 2002;82:12-22.

95. Zhang ZH, Wei SG, Francis J, Felder RB. Cardiovascular and renal sympathetic activation by blood-borne TNF-alpha in rat: the role of central prostaglandins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284(4):R916-27.

96. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993;54:1-78.

97. Wang P, Ba ZF, Chaudry IH. Administration of tumor necrosis factor- $\alpha$  in vivo depresses endothelium-dependent relaxation. *Am J Physiol* 1994;266(6 Pt 2):H2535-41.

98. Lefer AM, Ma XL. Cytokines and growth factors in endothelial dysfunction. *Crit Care Med* 1993;21(2 Suppl):S9-14.

99. Orshal JM, Khalil RA. Reduced endothelial NO- cGMP-mediated vascular relaxation and hypertension in IL-6-infused pregnant rats. *Hypertension* 2004;43(2):434-44.

100. Giardina JB, Green GM, Cockrell KL, Granger JP, Khalil RA. TNF- $\alpha$  enhances contraction and inhibits endothelial NO-cGMP relaxation in systemic vessels of pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Compr Physiol* 2002;283(1):R130-43.

101. Conrad KP, Benyo DF. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1997;37(3):240-9.

102. Granger JP, Alexander BT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens* 2001;14(6 Pt 2):178S-185S.

103. Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 1990;70(2):427-51.

104. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of preeclampsia: linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction. *Microcirculation* 2002;9(3):147-60.

105. Alexander BT, Cockrell K, Cline FD, Llinas MT, Sedeek M, Granger JP. Effect of angiotensin II synthesis blockade on the hypertensive response to

chronic reductions in uterine perfusion pressure in pregnant rats. *Hypertension* 2001;38(3 Pt 2):742-5.

106. Alexander BT, Rinewalt AN, Cockrell KL, Massey MB, Bennett WA, Granger JP. Endothelin type a receptor blockade attenuates the hypertension in response to chronic reductions in uterine perfusion pressure. *Hypertension* 2001;37(2 Part 2):485-9.

107. LaMarca BB, Cockrell K, Sullivan E, Bennett W, Granger JP. Role of endothelin in mediating tumor necrosis factor-induced hypertension in pregnant rats. *Hypertension* 2005;46(1):82-6.

108. Haber E, Koerner T, Page LB, Kliman B, Purnode A. Application of a radioimmunoassay for angiotensin I to the physiologic measurements of plasma renin activity in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1969;29(10):1349-55.

109. Nakano J, Takizawa H, Ohtoshi T, Shoji S, Yamaguchi M, Ishii A, Yanagisawa M, Ito K. Endotoxin and pro-inflammatory cytokines stimulate endothelin-1 expression and release by airway epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 1994;24(4):330-6.

110. Mitchell MD, Lundin-Schiller S, Edwin SS. Endothelin production by amnion and its regulation by cytokines. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165(1):120-4.

111. Yamashita J, Ogawa M, Nomura K, Matsuo S, Inada K, Yamashita S, Nakashima Y, Saishoji T, Takano S, Fujita S. Interleukin 6 stimulates the production of immunoreactive endothelin 1 in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1993;53(3):464-7.

112. Kahaleh MB, Fan PS. Effect of cytokines on the production of endothelin by endothelial cells. *Clin Exp Rheumatol* 1997;15(2):163-7.

113. Kanse SM, Takahashi K, Lam HC, Rees A, Warren JB, Porta M, Molinatti P, Ghatei M, Bloom SR. Cytokine stimulated endothelin release from endothelial cells. *Life Sci* 1991;48(14):1379-84.

114. Hall JE, Brands NW. The renin-angiotensin-aldosterone systems: renal mechanisms and circulatory homeostasis. In: Laragh and Brenner, editors. *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York, NY: Raven Press Ltd, 1992. p 1455-504.

115. Cid MC, Kleinman HK, Grant DS, Schnaper HW, Fauci AS, Hoffman GS. Estradiol enhances leucocyte binding to tumor necrosis factor (TNF)-stimulated endothelial cells via an increase in TNF-induced adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule type 1, and vascular cell adhesion molecule type 1. *J Clin Invest* 1994;93(1):17-25.

116. Roberts JM, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M; NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension* 2003;41(3):437-45.

117. Galão AO, de Souza LH, da Costa BP, Scheibe RM, Poli de Figueiredo CE. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in preeclampsia and normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191(3):821-4.

118. Pinheiro da Costa BE, LaMarca B, Fournier L, Bisinela FP, Gadonski G, Poli de Figueiredo CE, Granger JP. Maternal plasma and placental cytokine profile in preeclampsia [abstract]. In: American Society of Hypertension

Inc. 21<sup>st</sup> Annual Scientific Meeting and Exposition; 2006 Mai 16-20; New York. J

Clin Hypert 2006(8):5. Abstract nr P-146.



## ANEXO 1

## Effect of L-NIO on Renal Hemodynamic Changes During Pregnancy

G. Gadonski <sup>1,2</sup>, B. T. Alexander <sup>1</sup>, C. E. Poli de Figueiredo <sup>2</sup>, J. P. Granger <sup>1</sup>

1. University of Mississippi Medical Center

Department of Physiology and Biophysics

2500 North State Street

Jackson, MS 39216 – 4505

2. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Department of Nephrology – Biomedical Research Institution

6690 Ipiranga Avenue – São Lucas Hospital / Second Floor

Porto Alegre, RS 90610 – 000

To whom correspondence should be sent:

Joey P. Granger, PhD

University of Mississippi Medical Center

Department of Physiology and Biophysics

2500 North State Street

Jackson, MS 39216-4505

Phone / Fax: (601) 984 1820 / 984 1817

Email: [jgranger@physiology.umsmed.edu](mailto:jgranger@physiology.umsmed.edu)

Short title: L-NIO and pregnancy

Key words: L-NIO, kidney, hemodynamic, pregnancy

## Abstract

Pregnancy is associated with marked increases in renal hemodynamics that are mediated by factors such as nitric oxide (NO). The purpose of this study was to investigate the role of endothelial NO synthase (eNOS) in mediating these changes using the most potent eNOS inhibitor (N-iminoethyl-L-ornithine: L-NIO). Acute administration of L-NIO in pregnant rats (day 16 of gestation) decreased glomerular filtration rate ( $2.7 \pm 0.3$  versus  $2.0 \pm 0.2$  ml/min) and renal plasma flow ( $10 \pm 1.0$  versus  $6.7 \pm 0.8$  ml/min) as well as increased renal vascular resistance ( $8.8 \pm 1.3$  versus  $15.3 \pm 3.3$  mmHg/ml/min). L-NIO had no renal hemodynamic effects in virgin rats. Therefore, these findings suggest that eNOS may play a role in renal hemodynamic changes during pregnancy.

Significant alterations in renal function occur during normal pregnancy. Compared to prepregnant values, there is an increase in renal plasma flow (RPF) ranging from 50 to 85% during early to mid-pregnancy. Increases in glomerular filtration rate (GFR) parallel increases in renal plasma flow (1).

Endogenous nitric oxide (NO) production increases during pregnancy (2). Reductions in cardiac output and blood flow to the kidneys, heart, lungs, liver, diaphragm and skeletal muscles occur in response to non-selective chronic NO synthase (NOS) inhibition (3). These findings strongly suggest that NO plays an important role in mediating the gestational alterations in renal and systemic hemodynamics.

The enzymatic formation of NO from arginine is catalyzed by NOS, a dioxygenase that exists in three isoforms. NOS isoforms can be divided into inducible (iNOS) and constitutive isoforms, endothelial (eNOS) and neuronal (nNOS) (4). We recently reported differential expression of renal NOS isoforms during pregnancy in rats with increased iNOS and nNOS and normal eNOS expression at mid-gestation (5). We also recently reported the role of iNOS and nNOS isoforms in pregnant rats (6,7). Infusion of a nNOS inhibitor, 7-nitroindazole, in pregnant rats reduced ERPF and GFR by ~ 25% and increased renal vascular resistance (RVR) by ~ 60% (6). iNOS blockade also attenuated the increase in GFR and RPF in pregnant rats (7).

Although recent studies have indicated that pregnancy is associated with increased activity of eNOS and nNOS in the kidney (8), we previously demonstrated a normal eNOS expression at mid-gestation during pregnancy in rats (5). Thus, the importance of eNOS in the contribution to the renal hemodynamic changes during pregnancy is unclear. The endothelial NO

synthase is inhibited in an enantiometrically specific manner by N-iminoethyl-L-ornithine (L-NIO) which has been used as a relatively selective or putative inhibitor of eNOS (9-13). The purpose of this study was to investigate the role of eNOS in mediating the renal hemodynamic changes during pregnancy. To achieve this objective, we determined the effects of L-NIO in conscious, chronically instrumented pregnant rats at day 16 of gestation.

All studies were performed in virgin or timed pregnant Sprague-Dawley rats purchased from Harlan Inc (Indianapolis, Ind). Animals were housed one to a cage in a temperature-controlled room (23°C) with a 12:12 hour light/dark cycle. All experimental procedures executed in this study were in accordance with National Institutes of Health guidelines for use and care of animals with all protocols approved by the Animal Care and Use Committee at the University of Mississippi Medical Center.

Animals were divided into two groups, virgin (N=13) and pregnant (N=15), with each group serving as its own control. At day 12 of gestation, pregnant rats were instrumented with catheters. Under 2% isoflurane delivered by an anesthesia apparatus, rats were surgically instrumented with catheters (V-6 tubing) in the left femoral artery for blood sampling and blood pressure monitoring and left femoral vein for drug infusion. Each catheter was filled with a 50:50 solution of heparin and saline. A midline lower abdominal incision was made and the bladder was cannulated with flare-tipped PE-90 tubing for urine collection. All catheters were tunneled to the back of the neck and exteriorized. After four recovery days, renal function and arterial pressure measurements were performed in pregnant and virgin rats.

On day 16 of pregnancy, rats were placed in modified restraining cages for renal function measurement (3). The catheters were flushed with 20% heparin solution. Femoral vein catheters were connected to an infusion pump that delivered saline containing [<sup>125</sup>I] iothalamate (Isotex Diagnostics) 0.05 mCi/Kg/min and para-aminohippurate (PAH, 24 mg/ml, Sigma Chemical Co) at a fixed rate of 3 ml/h. Arterial pressure was monitored in conscious rats with a pressure transducer connected to a pressure recorder. During a control period, one 30-minute urine and blood pressure collection was obtained, followed by collection of blood samples. Urine volume was determined gravimetrically. After the control period, L-NIO (20 mg/kg) was injected intravenously and another 60-minute stabilization period preceded the second recording of blood pressure and collection of urine during 30 minutes followed by collection of blood samples. N-iminoethyl-L-ornithine (L-NIO, Cayman Chemical), is considered to be one of the most potent eNOS inhibitor (14). L-NIO has been used as a selective eNOS inhibitor at doses ranging from 10 to 30 mg / Kg (9-11).

GFR and ERPF were calculated from the radioactivity of I <sup>125</sup> and concentration of PAH, respectively, in plasma and urine.

All data are expressed as means  $\pm$  SE. Statistical comparisons between virgin and pregnant within control or L-NIO-treated groups were made by a paired Student's *t*-test. Comparisons between virgin and pregnant groups under baseline conditions or after L-NIO infusion were made by unpaired Student's *t*-test. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

Under basal conditions, there were no significant difference in mean arterial pressure (Figure 1) between virgin ( $116 \pm 5$  mmHg) and pregnant ( $108 \pm 2$  mmHg) rats (figure 1). Acute infusion of L-NIO had no effect on arterial

pressure in virgin ( $111 \pm 4$  mmHg) or pregnant ( $109 \pm 2$  mmHg) rats. Virgin rats weighed an average of  $228 \pm 4$  while pregnant rats weighed  $276 \pm 5$  g at day 16 of gestation.

GFR (Figure 1) was increased by 42% in pregnant rats at day 16 of gestation ( $2.7 \pm 0.3$  ml / min) as compared with virgin rats ( $1.9 \pm 0.3$  ml / min). Acute infusion of L-NIO into pregnant rats at day 16 of gestation resulted in a significant decrease in GFR compared with baseline conditions ( $2.7 \pm 0.3$  versus  $2.0 \pm 0.2$  ml / min;  $P = 0.01$ ). However, L-NIO infusion had no significant effect on GFR in virgin rats ( $1.9 \pm 0.3$  versus  $1.8 \pm 0.2$  ml / min).

RPF was significantly increased in pregnant rats at day 16 of gestation ( $10 \pm 1.0$  ml / min) compared with virgin rats ( $7.0 \pm 1.0$  ml / min,  $P < 0.05$ ). Acute infusion of L-NIO in pregnant rats at day 16 of gestation resulted in a significant decrease in RPF ( $10 \pm 1.0$  ml / min versus  $6.7 \pm 0.8$  ml / min,  $P = 0.01$ ), but there was no significant effect in the virgin group ( $7.0 \pm 1.0$  versus  $6.3 \pm 0.7$  ml / min).

Renal vascular resistance was significantly decreased in the pregnant group at day 16 of gestation under basal conditions ( $8.8 \pm 1.3$  mmHg/ml/min) when compared with virgin rats ( $14.4 \pm 1.8$  mmHg/ml/min,  $P = 0.01$ ). In addition to markedly affecting GFR and RPF, L-NIO also increased RVR in pregnant group from  $8.8 \pm 1.3$  to  $15.3 \pm 3.3$  mmHg,  $P < 0.05$ . This finding was not observed in the virgin group ( $14.4 \pm 1.8$  versus  $14 \pm 1.5$  mmHg).

Measurements in renal hemodynamics during pregnancy in chronically catheterized, conscious rats demonstrated that GFR and ERPF are elevated by

approximately 26% and 20%, respectively, above nonpregnant controls at mid-gestation. Compelling evidence indicates that NO synthesis increases in the maternal vasculature during gestation and is required for the physiologic hemodynamic adaptations in the kidney (3). Nitric oxide production is significantly elevated during pregnancy and non-selective inhibition of NOS abolishes the increase in renal hemodynamics during pregnancy. We have recently reported that renal iNOS and nNOS expression increases at mid-gestation during pregnancy in the kidneys of pregnant rats and both are important in mediating the changes in renal hemodynamics that occur during mid-gestation (5-7). However, renal protein expression of the eNOS isoform is normal at mid-gestation in the rat (5). Although renal eNOS expression is normal during mid-pregnancy (5), a significant increase in the activity of calcium-dependent NOS has been reported (8,15). This finding could indicate increased eNOS activity. Thus, the importance of eNOS in the contribution to the renal hemodynamic changes during pregnancy is unclear.

To examine the potential contribution of eNOS derived NO to the renal hemodynamic changes during pregnancy, we used an irreversible inhibitor of eNOS, LNIO. This drug is approximately 4 times more potent as an inhibitor of endothelial NOS than the other arginine analogues (9). L-NIO has been used as a selective eNOS inhibitor at doses ranging from 10 to 30 mg/kg (10,11). Administration of L-NIO at a dose of 20mg/kg resulted in an attenuation of the renal hemodynamics changes that occurs during mid-pregnancy. In the present study, GFR and ERPF were 42% higher in pregnant rats than in virgin controls and RVR was 63% lower when compared with non-pregnant rats. Acute infusion of L-NIO into pregnant rats at day 16 of gestation resulted in significant

increases in renal vascular resistance and decreases in RPF and GFR. In sharp contrast, L-NIO administration into non-pregnant rats had no effect on renal vascular resistance, RPF and GFR. Although these results support a potential role for eNOS derived NO in influencing renal hemodynamics during pregnancy, we cannot rule out the possibility that L-NIO may also be affecting the other NOS isoforms, which are known to play a role in renal hemodynamics during pregnancy.

Significant decreases in MAP normally occur during late gestation in the gravid rat (5). We found no significant differences in MAP between pregnant rats at mid-gestation and virgin rats, an observation reported in other studies (5,6). Acute administration of L-NIO infusion also had no significant effect on MAP in virgin and pregnant rats, however, others have reported increases in MAP after acute L-NIO infusion in male rats under anesthesia (9). eNOS knockout mice have significantly higher systolic blood pressure than control mice (+15 mmHg) under resting, conscious conditions, but this difference disappears during pregnancy (16,17), indicating that MAP is not influenced by eNOS during pregnancy.

In summary, pregnancy is associated with marked increases in renal hemodynamics that are mediated by factors such as nitric oxide. To investigate the role of endothelial NO synthase (eNOS) in mediating these changes we used the most potent eNOS inhibitor (N-iminoethyl-L-ornithine: L-NIO) identified to date. Acute administration of L-NIO in pregnant rats decreased glomerular filtration and renal plasma flow as well as increased renal vascular resistance. In sharp contrast, L-NIO had no renal hemodynamic effects in virgin rats. These



findings suggest that eNOS may play a role in renal hemodynamic changes during pregnancy.

### References

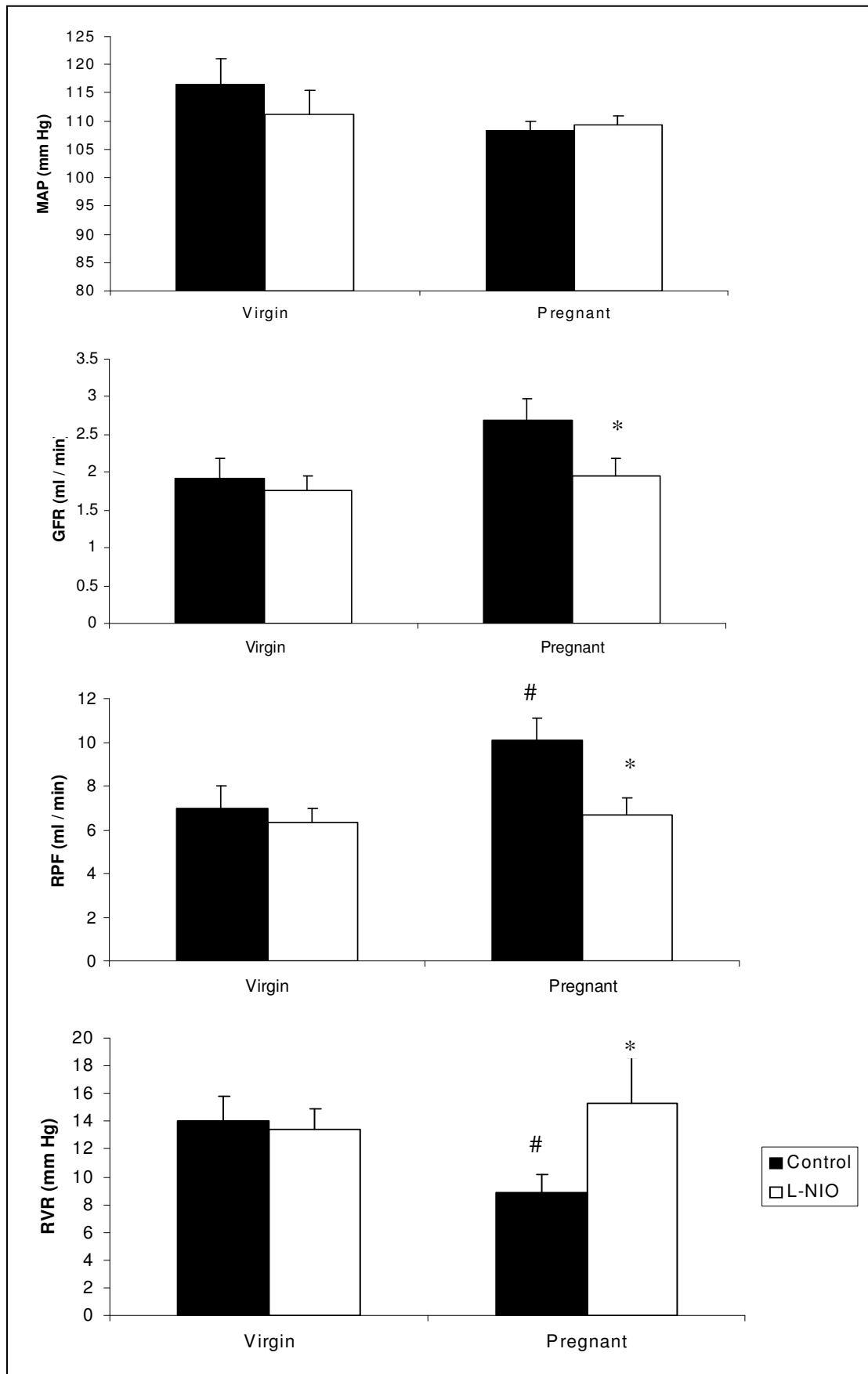
1. Davison JM, Dunlop M (1980). Renal hemodynamics and tubular function in normal human pregnancy. *Kidney international*, 18: 152-161.
2. Conrad KP, Fofee GM, Kruszyna H, Kruszyna R, Rochelle LG, Smith RP, Chavez JE, Mosher MD (1993). Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7: 566-571.
3. Kassab S, Miller T, Hester R, Novak J, Granger JP (1998). Systemic hemodynamics and regional blood flow during chronic nitric oxide synthesis inhibition in pregnant rats. *Hypertension*, 31[part2]: 315-320.
4. Bachman S, Munel P (1994). Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization and function. *American Journal of Kidney Diseases*, 24: 112-129.
5. Alexander BT, Miller MT, Kassab S, Novak J, Reckelhoff J, Kruckeberg WC, Granger JP (1999). Differential expression of renal nitric oxide synthase isoforms during pregnancy in rats. *Hypertension*, 33[part II]: 435-439.
6. Abram SR, Alexander BT, Bennet WA, Granger JP (2001). Role of neuronal nitric oxide synthase in mediating renal hemodynamic changes during pregnancy. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 281: R1390-R1393.

7. Alexander BT, Cockrell K, Cline FD, Granger JP (2002). Inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates renal hemodynamics during pregnancy. *Hypertension*, 36[part2]: 586-590.
8. Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S (1994). Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 91: 5212-16.
9. Rees DD, Palmer RMJ, Hodson HF, Moncada S (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *British Journal of Pharmacology*, 101: 746-752.
10. Li S, Ohgami Y, Dai Y, Quock RM (2003). Antagonism of nitrous oxide-induced anxiolytic-like behavior in the mouse light/dark exploration procedure by pharmacologic disruption of endogenous nitric oxide function. *Psychopharmacology*, 166(4): 366-72.
11. Jiang MH, Kaku T, Hada J, Hayashi Y (2002). Different effects of eNOS and nNOS inhibition on transient forebrain ischemia. *Brain Research*, 946: 139-147.
12. Xu Z, Park S, Mueller RA, Bagnell RC, Patterson C, Boysen PG (2005). Adenosine produces nitric oxide and prevents mitochondrial oxidant damage in rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 65: 803-812.
13. Ishide T, Preuss CV, Maher TJ, Ally A (2005). Neurochemistry within ventrolateral medulla and cardiovascular effects during static exercise following eNOS antagonism. *Neuroscience Research*, 52: 21-30.

14. McCall TB, Feelish M, Palmer RMJ, Moncada S (1991). Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. *British Journal of Pharmacology*, 102: 234-238.
15. Weiner CP, Knowles RG, Moncada S (1994). Induction of nitric oxide synthases early in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 171: 838-43.
16. Ortiz PA, Garvin JL (2003). Cardiovascular and renal control in NOS-deficient mouse models. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 284: R628-R638.
17. Shesely EG, Gilbert C, Granderson G, Carretero CD, Carretero OA, Beierwaltes WH (2001). Nitric oxide synthase gene knockout mice do not become hypertensive during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 185: 1198-1203.

## Figure Legend

Figure 1. Changes in mean arterial pressure (MAP), glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF) and renal vascular resistance (RVR) in response to an intravenous infusion of L-NIO (20 mg / Kg) in bolus in conscious virgin and pregnant rats. All values are expressed as means  $\pm$  SE. \*  $P < 0.05$  versus control # versus virgin control.



## ANEXO 2

## Hypertension Produced by Reductions in Uterine Perfusion in the Pregnant Rat

### Role of Interleukin 6

Giovani Gadonski, B. Babbette D. LaMarca, Elizabeth Sullivan, William Bennett,  
Derrick Chandler, Joey P. Granger

**Abstract**—The purpose of this study was to determine the role of interleukin (IL) 6 in mediating the increase in arterial pressure (AP) in response to chronic reductions in uterine perfusion pressure (RUPP) in pregnant rats. AP was higher in RUPP rats ( $138 \pm 1$  mm Hg) than in normal pregnant (NP) rats ( $104 \pm 1$  mm Hg). Serum IL-6 levels in the RUPP rats were  $104.5 \pm 28.6$  pg/mL as compared with  $36.6 \pm 7.4$  pg/mL in NP rats. To determine the long-term effects of a 2- to 3-fold elevation in plasma IL-6 on renal function and AP in pregnant rats, we infused IL-6 for 5 days (2.5 ng/day) in NP rats starting at day 14 of gestation. Five days later, serum IL-6 levels were  $55.5 \pm 6.5$  pg/mL in the control NP rats and  $157.0 \pm 36.1$  pg/mL in the IL-6-treated NP rats. AP was higher in the IL-6-treated NP rats ( $115 \pm 3$  mm Hg) as compared with NP controls ( $101 \pm 1$  mm Hg) at day 19 of gestation. Renal plasma flow and GFR were lower in the IL-6-treated NP rats than in the NP group. IL-6 increased plasma renin activity but did not affect endothelin in IL-6-treated NP rats. In contrast to the NP rats, IL-6 had no effect on AP or renal hemodynamics in virgin rats. In summary, these data indicate that plasma IL-6 is elevated in response to chronic reductions in uterine perfusion in pregnant rats and that a comparable elevation in plasma IL-6 increases AP and reduces renal function in pregnant rats. (*Hypertension*. 2006;48:1-6.)

**Key Words:** kidney ■ cytokines ■ hypertension ■ endothelin

Inflammatory cytokines such as interleukin (IL) 6 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  are thought to be important links between placental ischemia and cardiovascular and renal dysfunction.<sup>1-4</sup> Supporting a potential role of cytokines in preeclampsia are findings that plasma levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 are elevated in women with preeclampsia.<sup>1-6</sup> Important blood pressure regulatory systems, such as the renin-angiotensin system, sympathetic nervous system, and endothelial factors, interact with proinflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- $\alpha$ .<sup>7-12</sup> Angiotensin II not only enhances the synthesis of TNF- $\alpha$  and IL-6, it also seems that IL-6 may play an important role in mediating the hypertension produced by angiotensin II in mice.<sup>9</sup>

Proinflammatory cytokines also affect vascular function and endothelium-derived factors involved in blood pressure regulation.<sup>12-16</sup> TNF- $\alpha$  and IL-6 have both been shown to induce structural, as well as functional, alterations in endothelial cells.<sup>1,18</sup> These cytokines alter the production of a number of endothelial cell substances and reduce acetylcholine-induced vasodilatation.<sup>1,12-17</sup> Thus, endothelial dysfunction associated with many forms of hypertension may, in part, be mediated by proinflammatory cytokines.

Although inflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- $\alpha$ , have been reported to be elevated in preeclamptic women, the importance of these cytokines in mediating the cardiovascular and renal dysfunction in response to placental ischemia during pregnancy has yet to be fully elucidated. We reported previously that chronic reductions in uterine perfusion pressure (RUPP) in pregnant rats increases arterial pressure (AP) and reduces renal plasma flow (RPF) and glomerular filtration rate (GFR).<sup>18-24</sup> Moreover, we reported recently that serum levels of TNF- $\alpha$  are elevated in RUPP rats, and chronic infusion of TNF- $\alpha$  into pregnant rats increases AP and decreases RPF and GFR.<sup>23</sup> Although IL-6, which can be activated by TNF- $\alpha$ , is elevated in women with preeclampsia, it is unclear whether the hypertension associated with chronic RUPP in pregnant rats is associated with elevated plasma levels of IL-6. In addition, it is also uncertain whether IL-6 contributes to the hypertension associated with chronic reductions in uterine perfusion in pregnant rats. Therefore, the purpose of this study was to determine the role of IL-6 in mediating the cardiovascular and renal changes observed during chronic RUPP in pregnant rats. To achieve this goal, we first determined whether the hypertension

Received January 31, 2006; first decision February 26, 2006; revision accepted July 17, 2006.

This paper was sent to Friedrich C. Luft, associate editor, for review by expert referees, editorial decision, and final disposition.

From the Departments of Physiology and Obstetrics-Gynecology and Center for Excellence in Cardiovascular-Renal Research, University of Mississippi Medical Center, Jackson, Miss.

Correspondence to Joey P. Granger, University of Mississippi Medical Center, Department of Physiology and Biophysics, 2500 North State St, Jackson, MS 39216-4505. E-mail jgranger@physiology.umsmed.edu

© 2006 American Heart Association, Inc.

*Hypertension* is available at <http://www.hypertensionaha.org>

DOI: 10.1161/01.HYP.0000238442.33463.94

associated with chronic RUPP in pregnant rats is associated with elevated serum levels of IL-6. The second objective was to determine the AP and renal hemodynamic effects of infusing IL-6 into chronically instrumented pregnant rats and virgin rats at a rate that mimics plasma levels observed in the RUPP rats. Because important blood pressure regulatory systems, such as the renin-angiotensin and endothelin systems, interact with proinflammatory cytokines, we also assessed the effects of IL-6 on endothelin production and plasma renin activity.

### Methods

All of the studies were performed in age-matched, timed pregnant and virgin Sprague-Dawley rats purchased from Harlan Sprague Dawley Inc (Indianapolis, Ind.). Animals were housed in a temperature-controlled room (23°C) with a 12:12-hour light/dark cycle. All of the experimental procedures executed in this study were in accordance with National Institutes of Health guidelines for use and care of animals, and the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of Mississippi Medical Center approved all of the protocols.

#### Effect of Chronic Reductions in Uterine Perfusion Pressure on Arterial Pressure and Serum Levels of IL-6

Experiments were performed in the following groups of rats: normal pregnant (NP) controls (n=16) and RUPP pregnant rats (n=10). All of the pregnant and virgin rats undergoing surgical procedures were anesthetized with 2% isoflurane (W.A. Butler Co) delivered by an anesthesia apparatus (Vaporizer for Forane Anesthetic, Ohio Medical Products). Pregnant rats entering the RUPP group underwent the clipping procedure at day 14 of gestation. After a midline incision, the lower abdominal aorta was isolated, and a silver clip (0.203-mm ID) was placed around the aorta above the iliac bifurcation. Branches of both the right and left ovarian arteries were clipped using a silver clip (0.100-mm ID) as described previously.<sup>19,21-23</sup> Rats were also surgically instrumented with a carotid catheter for subsequent AP measurements. Arterial pressure measurements and blood samples were obtained on day 19 of gestation.

#### Effect of IL-6 on Arterial Pressure and Renal Hemodynamics in Conscious Chronically Instrumented Rats

Experiments were performed in the following groups of rats: pregnant controls (n=9), and IL-6-treated NP rats (2.5 ng/day; n=9). IL-6 (Recombinant Rat IL-6, R&D Systems) was infused for 5 days into NP rats during days 14 to 19 of gestation. Preliminary studies in our laboratory indicated that an IL-6 infusion rate of 2.5 ng/day was sufficient to achieve plasma levels comparable to those measured in RUPP rats. Additional experiments were performed in virgin control rats (n=9) and virgin rats treated with IL-6 (2.5 ng/day for 5 days; n=9) to examine the blood pressure and renal effects of IL-6 in virgin rats.

During isoflurane anesthesia, rats at day 14 of pregnancy were surgically instrumented with catheters (PE 50 tubing) in the femoral vein and carotid artery for blood sampling and blood pressure monitoring. Virgin rats were also surgically instrumented with catheters in the femoral vein and carotid artery for blood sampling and pressure monitoring. Virgin and pregnant rats were instrumented with jugular vein catheters connected to miniosmotic infusion pumps (Model 2002, Alzet Scientific Corporation). A midline lower abdominal incision was made, and the bladder was cannulated with flare-tipped PE 90 tubing for urine collection. All of the catheters were tunneled to the back of the neck and exteriorized.

Renal hemodynamics and APs were determined in control pregnant rats and pregnant rats treated with IL-6 at day 19 of gestation. The femoral vein catheter was connected to an infusion pump that

delivered isotonic saline containing [<sup>125</sup>I] iothalamate (Isotex Diagnostics; 0.05 mCi kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) and para-aminohippurate (24 mg/mL, Sigma Chemical Co) at a fixed rate of 3 mL/h. Arterial pressure was monitored with a pressure transducer connected to an AP recording device. After a 1-hour equilibration period, 2- to 20-minute clearances were obtained in each rat. Urine volume was determined gravimetrically. GFR and RPF were calculated from concentrations of [<sup>125</sup>I] and PAH, respectively, in plasma and urine.<sup>23</sup> Renal vascular resistance (RVR) was calculated by dividing the AP by the renal blood flow. After the second clearance, the rats were placed under anesthesia (2% isoflurane), and a midline abdominal incision was performed to access the aorta for blood collection and storage in silicone-coated glasses (Sherwood Medical Co) using 19G 3/4 needles (Becton Dickinson Vacutainer Systems). Serum was collected and kept at -80°C. Other samples were drawn into tubes containing EDTA, centrifuged for plasma separation, and stored at -20°C. Kidneys were removed for measurement of preproendothelin.

#### Determination of Serum IL-6 Levels

The colorimetric ELISA (R&D Systems) method was used for quantification of serum IL-6 levels. Interassay and intra-assay precision was 10.0% and 8.8%, respectively. This assay displayed a sensitivity level of <10 pg/mL.

#### Measurement of Plasma Endothelin Concentration

Plasma endothelin levels were determined using a human endothelin ELISA kit supplied by R&D Systems. Endothelin was isolated from 1.0 mL of plasma in 1.5 mL of extraction solvent (40:1:5, acetone:1 N HCl:water). The extraction procedure was carried out following the protocol outlined in the sample preparation of the manufacturer instructions. The interassay and intra-assay precision was 4.5% and 6.5%, respectively. The minimal detectable level of endothelin was <1.0 pg/mL.

#### Determination of Kidney Preproendothelin Levels

To determine the effect of IL-6 on renal production of endothelin, we also examined preproendothelin mRNA levels in the kidney. The cortex and medulla of the kidneys from 6 NP and 8 IL-6-treated pregnant rats were separated immediately after harvesting and quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.<sup>25</sup> Total RNA was extracted using the total RNA kit supplied by Ambion after the cortex and medulla were crushed in liquid nitrogen with a mortar and pestle. Isolation procedure was then performed as outlined in the instructions provided by the manufacturer.

Genomic DNA was digested with DNase I following instructions outlined by Ambion. RNA was quantified spectrophotometrically using an Eppendorf BioPhotometer. cDNA was synthesized from 5 µg of RNA with Invitrogen's Superscript II reverse transcriptase using the following primers: preproendothelin forward 1: ctaggctacgcgatccttg and preproendothelin reverse 1: tcttctgtcctgctg, supplied by custom primers from Life Technologies.

Real-time PCR was performed with the BioRad Sybre Green supermix and iCycler using a nested forward primer, preproendothelin forward 2: ctaggctacgcgatccttg, and the reverse primer outlined above. β-Actin was used as the housekeeping gene.

#### Measurement of Plasma Renin Activity

Renin activity in plasma was measured by radioimmunoassay using a modification of the method of Haber et al<sup>25</sup> (AI standards, tracer, and antibody, National Bureau of Standards, New England Nuclear, and Arnel, respectively).

#### Statistical Analysis

All of the data are expressed as mean±SEM. Comparisons for multigroup and multifactorial analysis were performed by 2-way ANOVA and by using the unpaired *t* test for comparison between control and experimental groups. The criterion for significant differences between groups of study was *P*<0.05.

## Results

### Mean AP and Serum IL-6 Levels in Response to Reductions in Uterine Perfusion Pressure in Pregnant Rats

Mean AP was significantly higher in RUPP rats than in control pregnant rats (Figure 1). Associated with the elevation in AP in RUPP rats were increases in serum levels of IL-6.

### Serum IL-6 Levels and APs in Control and IL-6-Treated Pregnant Rats

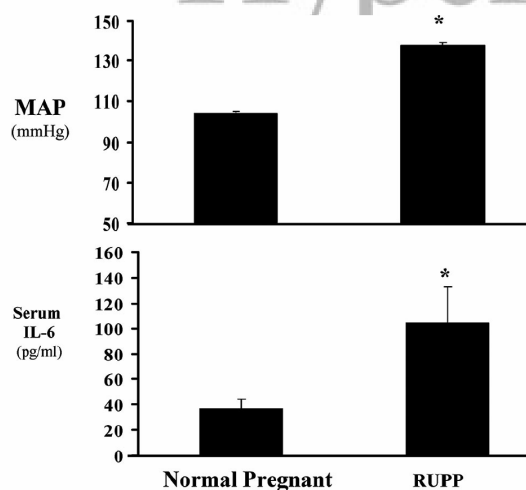
Figure 2 illustrates that serum levels of IL-6 in control pregnant rats and in pregnant rats infused with IL-6 for 5 days at a rate of 2.5 ng/day had an  $\approx 3$ -fold elevation in serum levels of IL-6, which is comparable to the serum levels observed in RUPP rats. Figure 2 also illustrates mean APs in control pregnant rats and in pregnant rats infused with IL-6 for 5 days at a rate of 2.5 ng/day. Mean AP averaged  $101 \pm 1$  mm Hg in control pregnant rats. AP in pregnant rats infused with IL-6 at a rate of 2.5 ng/day averaged  $115 \pm 3$  mm Hg, which was  $\approx 15\%$  above control rats.

### Renal Hemodynamics in Control and IL-6-Treated Pregnant Rats

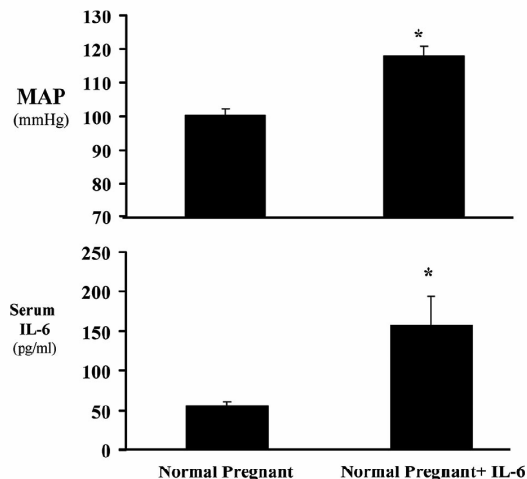
The differences in renal hemodynamics observed in control pregnant rats and in pregnant rats infused with IL-6 for 5 days at a rate of 2.5 ng/day are shown in Figure 3. RVR was significantly increased in pregnant rats infused with IL-6 at a dose of 2.5 ng/day as compared with control pregnant rats. RPF and GFR were decreased in pregnant rats infused with IL-6 at a dose of 2.5 ng/day as compared with control rats.

### Effect of IL-6 on AP and Renal Hemodynamics in Virgin Rats

In contrast to the pregnant rats, increasing IL-6 serum levels in virgin rats had no effect on mean AP (Figure 4). Moreover, there was no significant difference in RVR ( $10.7 \pm 1.2$  versus  $11.2 \pm 0.6$  mm Hg/mL per minute), GFR ( $2.2 \pm 0.1$  versus



**Figure 1.** Mean AP and serum concentration of IL-6 in control pregnant rats and RUPP rats at day 19 of gestation.  $*P < 0.05$  vs control pregnant rats. All data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

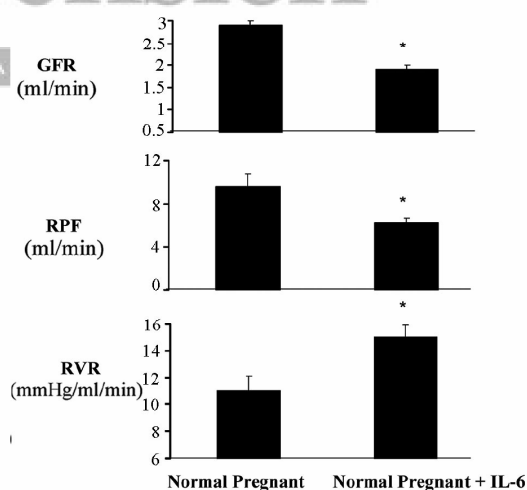


**Figure 2.** Mean AP and serum concentration of IL-6 in control pregnant rats and IL-6-treated pregnant rats at day 19 of gestation.  $*P < 0.05$  vs control pregnant rats. All data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

$2.1 \pm 0.2$  mL/min), and effective renal plasma flow (ERPF) ( $9.2 \pm 1$  versus  $8.9 \pm 0.7$  mL/min) between the IL-6-treated group as compared with control virgin group, respectively.

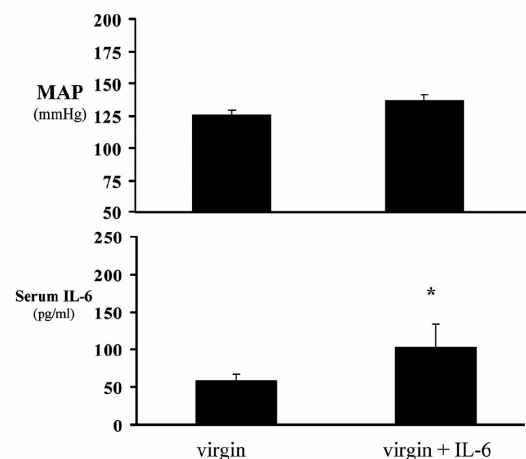
### Effect of IL-6 on Plasma Endothelin, Renal Preproendothelin, and Plasma Renin Activity in Pregnant Rats

There were no significant differences in the plasma endothelin levels between NP rats and IL-6-treated pregnant rats. In addition, the renal preproendothelin levels were not significantly different between the IL-6-treated pregnant rats and the pregnant control rats. In contrast, IL-6-treated pregnant rats had significantly higher levels of plasma renin activity (Figure 5) when compared with control pregnant animals.



**Figure 3.** RVR, RPF, and GFR in control pregnant rats and IL-6-treated pregnant rats at day 19 of gestation.  $*P < 0.05$  vs control pregnant rats. All data are expressed as mean  $\pm$  SEM.



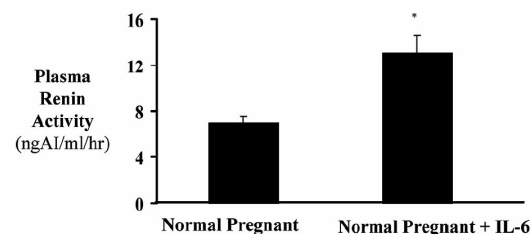


**Figure 4.** Mean AP and serum concentration of IL-6 in control virgin rats and IL-6-treated virgin rats. All data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

### Discussion

We report in this study that the elevation in AP in RUPP rats is associated with significant increases in serum levels of IL-6. Moreover, we report that chronic elevation in serum levels of IL-6, comparable to levels observed in RUPP rats, results in significant increases in AP in pregnant rats. The increase in AP is associated with increases in RVR and reductions in RPF and GFR. Furthermore, the increase in AP was associated with an activation of the renin-angiotensin system as indicated by an enhanced plasma renin activity in IL-6-treated pregnant rats. These results indicate that IL-6 may play a role in mediating the increase in AP and reduction in renal hemodynamics observed in reductions in uterine perfusion in pregnant rats.

In this study, we infused IL-6 into pregnant rats to mimic levels of serum IL-6 observed in RUPP rats. Rat IL-6 was infused at a rate of 2.5 ng/day for 5 days, and plasma levels of rat IL-6 were measured by ELISA. The 2.5 ng/day dose increased serum concentrations of IL-6 to levels that were slightly above those observed in RUPP rats. The elevation in serum IL-6 resulted in significant increases in AP ( $\approx 15\%$ ) as compared with untreated pregnant rats at day 19 of gestation. The increase in AP in the IL-6-treated rats was associated with a 30% to 40% reduction in RPF and GFR. The decrease



**Figure 5.** Plasma renin activity in IL-6-treated pregnant and pregnant control rats. All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs pregnant control.

in renal hemodynamics in response to IL-6 is similar to the decrease in renal hemodynamics that we reported previously to occur in RUPP rats.<sup>23</sup> However, because the serum concentration of IL-6 in the IL-6-treated rats was slightly above those observed in RUPP rats, we may be overestimating the importance of IL-6 in mediating the reduction in renal function in RUPP rats.

The exact mechanisms whereby increases in plasma IL-6 elevate AP during pregnancy are not known. IL-6 causes endothelial dysfunction and enhanced vascular reactivity in vessels of pregnant rats.<sup>12-16</sup> We reported recently that the increase in AP produced by chronic elevations in plasma levels of TNF- $\alpha$  in pregnant rats is associated with significant increases in local production of endothelin in the kidney.<sup>24</sup> In addition, we reported that the increase in AP in response to TNF- $\alpha$  was completely abolished in pregnant rats treated with the endothelin receptor A antagonist.<sup>24</sup> We also reported previously that the hypertension in response to chronic reductions in uteroplacental perfusion pressure in the pregnant rat is associated with significant increases in renal expression of preproendothelin and that selective blockade of the ET<sub>A</sub> receptor virtually abolished the hypertension in response to chronic reductions in uteroplacental perfusion.<sup>22</sup> Collectively, these findings suggest that endothelin may play an important role in mediating cytokine-induced increases in AP in pregnant rats. Previous studies have reported an effect of high concentrations of IL-6 to stimulate endothelin synthesis by airway epithelial cells, human amnion cells, human breast cancer cells, and endothelial cells.<sup>26-30</sup> However, in the present study, we did not observe significant changes in plasma endothelin levels in pregnant rats infused with IL-6 at a rate to mimic serum levels observed in the RUPP rats. Considering that plasma levels of endothelin may not reflect local synthesis of endothelin, we also investigated renal expression of preproendothelin mRNA. In contrast to our findings in the TNF- $\alpha$  study,<sup>23</sup> chronic increases in plasma IL-6 in pregnant rats did not increase renal expression of preproendothelin mRNA in kidneys. These findings suggest that the increase in AP and reduction in renal function in response to IL-6 in pregnant rats may not be related to the renal endothelin system.

Other important blood pressure regulatory systems interact with proinflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- $\alpha$ .<sup>7-11</sup> Although there is experimental evidence that proinflammatory cytokines may activate the sympathetic nervous system,<sup>11</sup> it is not clear whether cytokines such as IL-6 activate the renin-angiotensin system. We reported previously that plasma renin activity is not elevated in RUPP rats.<sup>21</sup> However, in the present study, we report that IL-6-treated pregnant rats had significantly higher levels of plasma renin activity when compared with control pregnant animals. Although this effect of IL-6 on plasma renin activity could potentially lead to enhanced vasoconstriction, reduced pressure natriuresis, and hypertension,<sup>31</sup> the quantitative importance of the renin-angiotensin system in mediating the in vivo effects of IL-6 during pregnancy is unknown and remains to be an important area of investigation.

Interestingly, the renal and blood pressure response to IL-6 was unique to the pregnant rat. Comparable infusions of IL-6

in virgin rats had no renal or hypertensive effect. Enhanced susceptibility to the renal and cardiovascular effects of lipopolysaccharide and TNF- $\alpha$  during pregnancy has also been reported.<sup>23</sup> Faas et al<sup>32</sup> demonstrated previously that a single low-dose infusion of lipopolysaccharide elevated blood pressure and albumin excretion in pregnant rats but not virgin rats. LaMarca et al<sup>23</sup> also reported recently that chronic elevations in plasma TNF- $\alpha$  increased AP and reduced renal function in pregnant rats while having no effects in virgin rats. Although the exact mechanism for the enhanced sensitivity to inflammatory cytokines during pregnancy is unknown, it may be related to circulatory levels of sex steroids. Because progesterone and 17- $\beta$  estradiol are markedly elevated during gestation in rats, these steroids are potential mediators. Consistent with this suggestion are the findings of Cid et al,<sup>33</sup> demonstrating the ability of progesterone and estrogen to markedly enhance TNF- $\alpha$ -induced leukocyte stimulation of endothelial cell expression of adhesion molecules. Although these findings support a potential role for sex steroids in enhancing the endothelial response to inflammatory cytokines, the importance of estrogen and/or progesterone in enhancing endothelial activation and the hypertensive response to cytokines is unknown.

Most, but not all, investigators have reported significant elevations in plasma levels of IL-6 in women with preeclampsia.<sup>1-6</sup> The source of IL-6 in preeclampsia or in response to placental ischemia is uncertain.<sup>1,2,34</sup> Previous *in vitro* studies have implicated placental cytotrophoblasts as potential sites of cytokine synthesis in preeclampsia.<sup>2,33,35</sup> The fact that reductions in uterine perfusion in pregnant rats increase serum levels of IL-6 also suggests that the placenta may be a source for IL-6 production. However, recent studies in humans suggest that sources other than the placenta contribute to the elevated concentrations of cytokines found in the circulation of preeclamptic women.<sup>2,34,35</sup> Protein and mRNA levels of IL-6 are comparable in placentas delivered at term or preterm with or without preeclampsia.<sup>35</sup> Moreover, IL-6 production by villous placental tissue from preeclamptic women maintained in culture is decreased compared with that by villous explants from normal term placenta.<sup>2,35</sup> Thus, although IL-6 levels are increased in the circulation from preeclamptic women, the source of this IL-6 may not be the placenta but sources outside the placenta. Potential sources of IL-6 could be activated leukocytes or the maternal endothelium, which produce IL-6 on exposure to stimuli, such as TNF- $\alpha$ .<sup>1</sup> Although TNF $\alpha$  has been reported to be elevated in preeclamptic women and in RUPP rats, the relative importance of TNF- $\alpha$  in stimulating the increase in IL-6 in response to decreases in uterine perfusion, however, remains to be determined.

### Perspectives

Despite being one of the leading causes of maternal and perinatal morbidity and mortality, the pathophysiological mechanisms underlying the hypertension during preeclampsia are unknown.<sup>36,37</sup> Increases in circulating factors, such as inflammatory cytokines, including IL-6, may serve as an important mediator of maternal endothelial activation and/or dysfunction in preeclampsia. In this study, we report that the

elevation in AP in RUPP rats is also associated with significant increases in serum levels of IL-6. Moreover, we found that chronic elevation in serum levels of IL-6, comparable to levels observed in RUPP rats, results in significant increases in pregnant rats. The increase in AP is associated with increases in RVR and reductions in RPF and GFR. These results indicate that IL-6 may play a role in mediating the hypertension and reduction in renal hemodynamics observed in reductions in uterine perfusion in pregnant rats.

Although we have shown that IL-6 may play an important role in mediating the elevation in AP in response to reductions in uterine perfusion, the importance of IL-6 and other cytokines, such as TNF- $\alpha$ , in mediating the cardiovascular and renal alterations during preeclampsia in humans remain unclear. Furthermore, it is unknown whether drugs that inhibit the actions of inflammatory cytokines may be of benefit to women at high risk of developing preeclampsia. These important questions will not be answered until well-controlled clinical studies using specific inhibitors of cytokines are performed in women with preeclampsia.

### Sources of Funding

This work was supported by National Institutes of Health grants HL38499 and HL51971 and HL078147 and HL076145.

### Disclosures

None.

### References

1. Conrad KP, Benyo DF. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 1997;37:240-249.
2. Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Invest*. 2001;86:2505-2512.
3. Kupferminc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Rehnberg KA, Socol ML. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;170:1752-1757.
4. Vince GS, Starkey PM, Austgulen R, Kwiatkowski D, Redman CW. Interleukin-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1995;102:20-25.
5. Greer IA, Lyall F, Pereira T, Boswell F, Macara LM. Increased concentrations of cytokines interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in plasma of women with preeclampsia: a mechanism for endothelial dysfunction? *Obstet Gynecol*. 1994;84:937-940.
6. Kupferminc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Rehnberg KA, Socol ML. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;170:1752-1759.
7. Funakoshi Y, Ichiki T, Ito K, Takeshita A. Induction of interleukin-6 expression by angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1999;34:118-125.
8. Han Y, Runge MS, Braiser AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res*. 1999;84:695-703.
9. Lee DL, Sturgis LC, Labazi H, Osborne JB Jr, Fleming C, Pollock JS, Manhani M, Imig JD, Brands MW. Angiotensin II hypertension is attenuated in interleukin-6 knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290:H935-H940.
10. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, Egido J. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int*. 2002;82:12-22.
11. Zhang ZH, Wei SG, Francis J, Felder RB. Cardiovascular and renal sympathetic activation by blood-borne TNF in rat: the role of central prostaglandins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;284:R916-R927.

## 6 Hypertension October 2006

12. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol.* 1993;54:1-78.
13. Wang P, Ba ZF, Chaudry IH. Administration of tumor necrosis factor- $\alpha$  in vivo depresses endothelium-dependent relaxation. *Am J Physiol.* 1994; 266:H2535-H2541.
14. Lefer AM, Ma XL. Cytokines and growth factors in endothelial dysfunction. *Crit Care Med.* 1993;21:S9-S14.
15. Orshal JM, Khalil RA. Reduced endothelial NO-cGMP-mediated vascular relaxation and hypertension in IL-6 infused pregnant rats. *Hypertension.* 2004;43:1-11.
16. Giardina JB, Green GM, Cockrell KL, Granger JP, Khalil RA. TNF enhances contraction and inhibits endothelial NO-cGMP relaxation in systemic vessels of pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp.* 2002;283:R130-R143.
17. Pober J, Cotran R. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev.* 1990;70:427-451.
18. Granger JP, Alexander BT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *Am J Hyperten.* 2001;14:S178-S185.
19. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of preeclampsia: linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction. *Microcirculation.* 2002;9:147-160.
20. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Hypertension.* 2001;38:718-722.
21. Alexander BT, Cockrell K, Cline FD, Llinas MT, Sedeek M, Granger JP. Effect of angiotensin II synthesis blockade on the hypertensive response to chronic reductions in uterine perfusion pressure in pregnant rats. *Hypertension.* 2001;38:742-745.
22. Alexander BT, Rinewalt AN, Cockrell KL, Massey MB, Bennett WA, Granger JP. Endothelin type A receptor blockade attenuates the hypertension in response to chronic reductions in uterine perfusion pressure. *Hypertension.* 2001;37:485-489.
23. LaMarca BB, Bennett WA, Alexander BT, Cockrell K, Granger JP. Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Hypertension.* 2005;46:1022-1025.
24. LaMarca BB, Cockrell K, Sullivan E, Bennett W, Granger JP. Role of endothelin in mediating tumor necrosis factor-induced hypertension in pregnant rats. *Hypertension.* 2005;46:82-86.
25. Haber E, Koerner T, Page LB, Kliman B, Purnode A. Application of a radioimmunoassay for angiotensin I to the physiologic measurements of plasma renin activity in normal human subjects. *J Clin Endocr Metab.* 1969;29:1349-1355.
26. Nakano J, Takizawa H, Ohtoshi T, Shoji S, Yamaguchi M, Ishii A, Yanagisawa M, Ito K. Endotoxin and pro-inflammatory cytokines stimulate endothelin-1 expression and release by airway epithelial cells. *Clin Exper Allergy.* 1994;24:330-336.
27. Mitchel MD, Schiller SL, Edwin SS. Endothelin production by amnion and its regulation by cytokines. *Am J Obst Gynecol.* 1991;165:120-124.
28. Yamashita J, Ogawa M, Nomura K, Matsuo S, Inada K, Yamashita S, Nakashima Y, Saishoji T, Takano S, Fujita S. Interleukin-6 stimulates the production of immunoreactive endothelin 1 in human breast cancer cells. *Cancer Research.* 1993;53:464-467.
29. Kahaleh MB, Fan PS. Effect of cytokines on the production of endothelin by endothelial cells. *Clin Exp Rheumatol.* 1997;15:163-167.
30. Kanse SM, Takahashi K, Lam H, Rees Andrew, Warren JB, Porta M, Molinatti P, Ghatei M, Bloom SR. Cytokine stimulated endothelin release from endothelial cells. *Life Sci.* 1991;48:1379-1384.
31. Hall JE, Brands NW. The renin-angiotensin-aldosterone systems: renal mechanisms and circulatory homeostasis. In: Laragh J and Brenner B, eds. *The Kidney: Physiol and Pathophysiol.* 2nd ed. New York, NY: Raven Press Ltd; 1992:1455-1504.
32. Faas MM, Schuiling GA, Baller JF, Visscher CA, Bakker WW. A new animal model for human preeclampsia: ultra low-dose endotoxin infusion in pregnant rats. *Am J Obst Gynecol.* 1994;171:158-164.
33. Cid MC, Kleinman HK, Grant DS, Schnaper HW, Fauci AS, Hoffman GS. Estradiol enhances leukocyte binding to tumor necrosis factor (TNF)-stimulated endothelial cells via an increase in TNF-induced adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule type 1, and vascular cell adhesion molecule type 1. *J Clin Invest.* 1994;93:17-25.
34. Conrad KP, Miles TM, Benyo DF. Circulating levels of immunoreactive cytokines in women with preeclampsia. *Am J Rep Imm.* 1998;40:102-111.
35. Kauma SW, Wang Y, Walsh SW. Preeclampsia is associated with decreased placental interleukin-6 production. *J Soc Gynecol Invest.* 1995; 2:614-617.
36. Roberts JM, Lain KY. Recent insights into the pathogenesis of preeclampsia. *Placenta.* 2002;23:359-372.
37. Roberts JM, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M. NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension.* 2003;41:437-445. Disease and Stroke

## ANEXO 3

### Estudo Piloto

Este estudo foi realizado com o intuito de observar a dose diária de interleucina-6 a ser administrada para atingir os níveis séricos que mimetizassem aqueles encontrados no modelo RUPP. Esses níveis foram previamente identificados como sendo duas a três vezes maiores que o controle (Joey P. Granger, comunicação pessoal). Conforme ilustrado na Figura 11, no grupo controle submetido apenas ao estresse cirúrgico, observou-se nível de IL-6 de  $56,1 \pm 17,1$  pg/ml, enquanto que o grupo que recebeu 2,5 ng/dia apresentou aumento em torno de três vezes acima do controle ( $148,0 \pm 108,9$  pg/ml). O dobro da dose administrada se traduziu em aumento de cinco vezes no nível sérico inicial ( $258,8 \pm 29,0$  pg/ml), enquanto a concentração de 20 ng/dia atingiu níveis pouco acima do observado na dose anterior ( $284,0 \pm 24,3$  pg/ml) e a dose de 35 ng/dia induziu aumento para, aproximadamente, oito vezes o basal ( $397,0 \pm 81,9$  pg/ml, Figura 11)

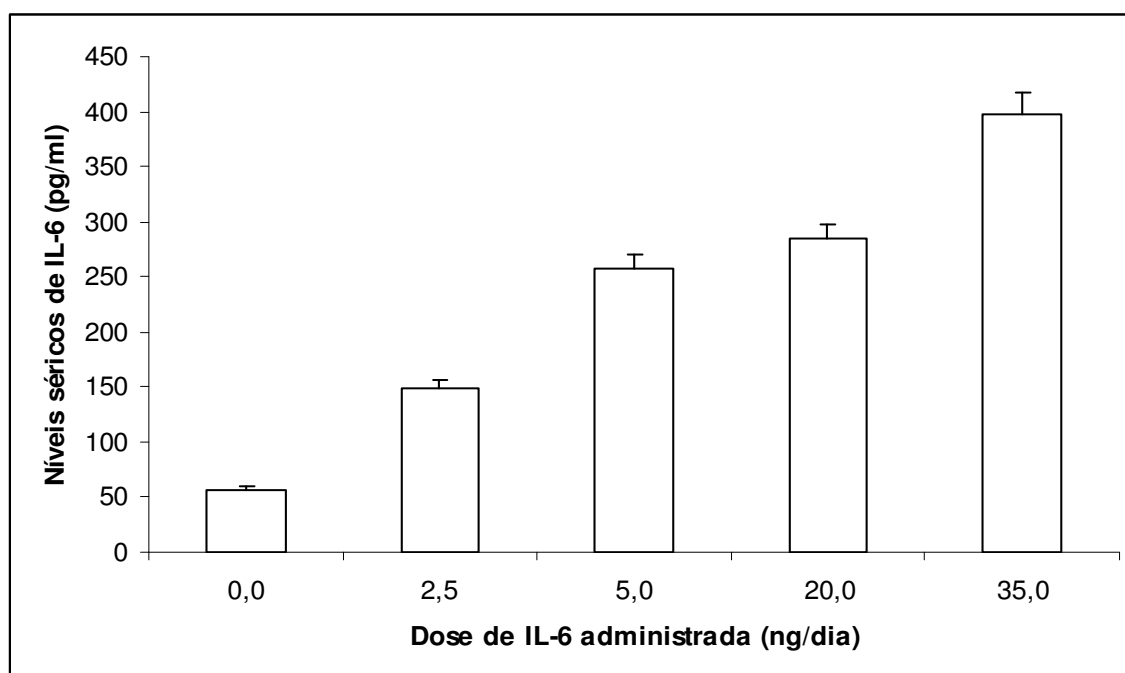


Figura 11. Níveis séricos de IL-6 de acordo com a dose diária administrada.

Concomitantemente, foi avaliado o peso inicial e após a infusão de IL-6 nos cinco grupos. Não houve diferença significativa entre eles, apesar de todos apresentarem diminuição do peso e da ingestão de ração (Tabela 1).

Tabela 1. Infusão de IL-6 e modificações no peso e na ingestão de ração.

Grupo	Dose IL-6 (ng/d)	Peso 1 (g)	Peso 2 (g)	Ração 1 (g/d)	Ração 2 (g/d)
1	0,0	234,6	229,6	15,8	13,8
2	2,5	237,2	235,3	14,6	13,9
3	5,0	234,5	229,1	15,8	13,9
4	20,0	235,4	231,2	15,4	13,9
5	35,0	235,4	231,3	15,4	13,9

Research article

Open Access

## Exercise increases endostatin in circulation of healthy volunteers

Jian-Wei Gu\*, Giovanni Gadonski, Julie Wang, Ian Makey and Thomas H Adair

Address: Department of Physiology & Biophysics, University of Mississippi Medical Center, Jackson, Mississippi 39216 USA

Email: Jian-Wei Gu\* - [jgu@physiology.umsmed.edu](mailto:jgu@physiology.umsmed.edu); Giovanni Gadonski - [ggadonski@physiology.umsmed.edu](mailto:ggadonski@physiology.umsmed.edu);

Julie Wang - [jwang@physiology.umsmed.edu](mailto:jwang@physiology.umsmed.edu); Ian Makey - [imakey@physiology.umsmed.edu](mailto:imakey@physiology.umsmed.edu);

Thomas H Adair - [thadair@physiology.umsmed.edu](mailto:thadair@physiology.umsmed.edu)

\* Corresponding author

Published: 16 January 2004

BMC Physiology 2004, 4:2

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1472-6793/4/2>

© 2004 Gu et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article: verbatim copying and redistribution of this article are permitted in all media for any purpose, provided this notice is preserved along with the article's original URL.

Received: 16 October 2003

Accepted: 16 January 2004

### Abstract

**Background:** Physical inactivity increases the risk of atherosclerosis. However, the molecular mechanisms of this relation are poorly understood. A recent report indicates that endostatin, an endogenous angiostatic factor, inhibits the progression of atherosclerosis, and suggests that reducing intimal and atherosclerotic plaque tissue neovascularization can inhibit the progression of atherosclerosis in animal models. We hypothesize that exercise can elevate the circulatory endostatin level. Hence, exercise can protect against one of the mechanisms of atherosclerosis.

**Results:** We examined treadmill exercise tests in healthy volunteers to determine the effect of exercise on plasma levels of endostatin and other angiogenic regulators. Oxygen consumption ( $\text{VO}_2$ ) was calculated. Plasma levels of endostatin, vascular endothelial growth factor (VEGF), and basic fibroblast growth factor (bFGF) were determined using ELISA. The total peak  $\text{VO}_2$  (L) in 7 male subjects was  $29.5 \pm 17.8$  over a 4–10 minute interval of exercise. Basal plasma levels of endostatin (immediately before exercise) were  $20.3 \pm 3.2$  pg/ml, the plasma levels increased to  $29.3 \pm 4.2$ ,  $35.2 \pm 1.8$ , and  $27.1 \pm 2.2$  ng/ml, at 0.5, 2, and 6 h, respectively, after exercise. There was a strong linear correlation between increased plasma levels of endostatin (%) and the total peak  $\text{VO}_2$  (L) related to exercise ( $R^2 = 0.9388$ ;  $P < 0.01$ ). Concurrently, VEGF levels decreased to  $28.3 \pm 6.4$ ,  $17.6 \pm 2.4$ , and  $26.5 \pm 12.5$  pg/ml, at 0.5, 2, and 6 h, respectively, after exercise. There were no significant changes in plasma bFGF levels in those subjects before and after exercise.

**Conclusions:** The results suggest that circulating endostatin can be significantly increased by exercise in proportion to the peak oxygen consumption under physiological conditions in healthy volunteers. These findings may provide new insights into the molecular links between physical inactivity and the risk of angiogenesis dependent diseases such as atherosclerosis.

### Background

Epidemiological data has established that physical inactivity increases the risk of many chronic diseases including atherosclerosis [1-3]. Coronary heart disease, ischemic stroke, and peripheral vascular disease are the clinical manifestations of atherosclerosis. Physical inactivity is

believed to be an independent risk factor for the development of coronary heart disease [4], stroke [5], and peripheral vascular disease [6]. However, exercise can exert a beneficial influence on the risk factors for atherosclerosis by reducing hyperlipidemia, hypertension, obesity, platelet aggregability; increasing insulin sensitivity; and

improving glucose tolerance [7]. Despite these findings, the molecular basis of interactions between body and exercise in relation to atherosclerosis are poorly understood.

Although atherosclerosis has complex and multifactorial mechanisms, recent evidence also suggests that angiogenesis plays a critical role in the progression of atherogenesis [8]. Angiogenesis, defined as the formation of new blood vessels from an existing capillary bed, plays an important role in wound healing, body development, and inflammation, which also occurs in a variety of pathological states. Progressive angiogenesis in a primary atherosclerotic lesion has been considered as a cause of plaque expansion, plaque vulnerability, and the risk of significant disease complications such as plaque rupture and vascular thrombosis [8-11]. Mounting evidence [12,13] suggests that angiogenesis is regulated by a net balance between positive (angiogenic) and negative (angiostatic) regulators of blood vessel growth. A balance shifted towards predominantly positive regulators is an angiogenic-phenotype, whereas, a shift favoring negative regulators is an angiostatic-phenotype. Therefore, the impaired regulation of angiogenesis is often associated with the development of angiogenesis-dependent diseases such as atherosclerosis. We hypothesize that exercise can increase endostatin (an angiostatic factor) in circulation, and thereby, it may be one of the mechanisms by which exercise can protect against atherosclerosis.

Why is endostatin thought to be an important molecule linked to angiogenesis-dependent diseases such as atherosclerosis? Endostatin is an endogenous angiostatic factor (inhibitor of angiogenesis) identified originally in conditioned media of Murine hemangioendothelioma cells [13,14]. In mice, recombinant endostatin decreased the size of established primary and secondary tumors, and repetitive application of the peptide prevented recurrence of the tumors by inhibiting tumor angiogenesis [12]. Recent evidence has indicated that endostatin can inhibit the progression of atherosclerosis in an ApoE-deficient mouse model by reducing intimal and plaque tissue neovascularization [15].

The present study seeks to determine: 1) whether exercise can increase plasma levels of endostatin in healthy volunteers; 2) whether increased plasma levels of endostatin are correlated with the intensity of exercise assessed by the peak oxygen consumption; and 3) whether exercise can affect plasma levels of angiogenic factors, such as VEGF and bFGF.

## Results

### General Characteristics and Response to Exercise

7 healthy-male-volunteers were assigned to the treadmill-exercise study (years of age,  $33 \pm 13$ ; body weight [kg]  $78 \pm 13$ ; mean  $\pm$  SD). The peak speed and the time spent at peak speed on the treadmill were  $4.85 \pm 0.99$  miles per hour and  $6.86 \pm 2.67$  minutes (ranging 4 to 10 minutes), respectively. The total duration of treadmill-exercise lasted an average of  $18.86 \pm 6.96$  minutes. At peak speed, the heart rate was significantly increased by 87% ( $P < 0.01$ ) from  $80 \pm 8$  beats/min (resting heart rate) to  $167 \pm 9$  beats/min (peak heart rate). Neither abnormal ECG signs nor abnormal symptoms were observed during or after exercise.

### Effect of Exercise on Oxygen Consumption

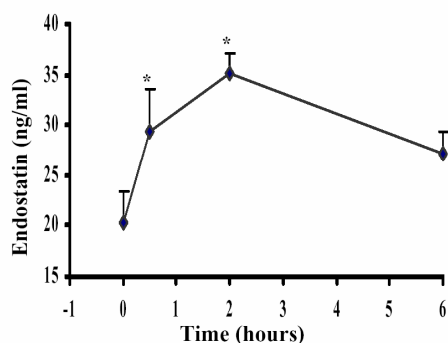
In this study, termination of exercise was based on the attainment of 80–93% of the maximal predicted heart rate and the tolerance of each individual. Therefore, these conditions caused differences in peak oxygen consumption for each volunteer. Using the mathematical equation [16], the estimated peak oxygen consumption (peak  $\text{VO}_2$ ; L/min) was  $4.06 \pm 1.08$  (mean  $\pm$  SD;  $n = 7$ ), and ranged from 2.67 to 5.88. The peak oxygen pulse (peak  $\text{O}_2$  pulse, ml/beat), calculated by dividing peak  $\text{VO}_2$  by heart rate, was  $24.36 \pm 6.77$ , and ranged from 16.18 to 37.45. Regression analysis shows a strong linear correlation between peak  $\text{O}_2$  pulse and peak  $\text{VO}_2$  in different individuals ( $R = 0.9571$ ;  $R^2 = 0.9505$ ;  $P < 0.01$ ). The total peak  $\text{VO}_2$  (L), considered as the product of peak  $\text{VO}_2$  and the time spent running at that peak, was  $29.5 \pm 17.8$ , and ranged from 12.7 to 58.8.

### Effect of Exercise on Plasma Levels of Endostatin

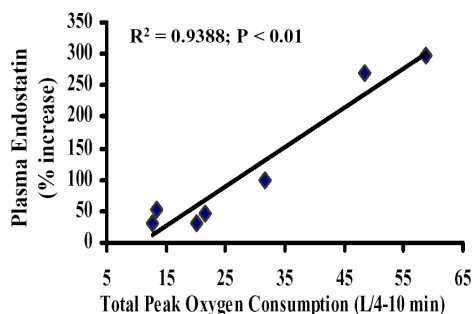
Figure 1 shows that exercise increased plasma levels of endostatin in healthy volunteers. Basal plasma levels of endostatin (immediately before exercise) were  $20.3 \pm 3.2$  ng/ml (mean  $\pm$  SE;  $n = 7$ ). The plasma levels increased to  $29.1 \pm 4.2$ ,  $35.2 \pm 1.8$ , and  $27.1 \pm 2.2$  ng/ml, respectively, at 0.5, 2, and 6 h after treadmill exercise. The percent increases in plasma endostatin concentrations were 43% ( $P = 0.014$ ), 73% ( $P = 0.004$ ), and 33% ( $P = 0.034$ ) at 0.5 h, 2 h, and 6 h after exercise, respectively, compared to the pre-exercise levels. Figure 2 shows a strong linear correlation between % increase in plasma levels of endostatin and the total peak  $\text{VO}_2$  ( $R = 0.969$ ;  $R^2 = 0.9388$ ;  $P < 0.01$ ).

### Effect of Exercise on Plasma Levels of VEGF and bFGF

We also investigated the effect of exercise on plasma levels of VEGF and bFGF. We found that acute treadmill-exercise causes a decrease in plasma levels of VEGF in healthy volunteers. These changes are statistically significant at 2 h after exercise compared to the basal levels immediately before exercise ( $P = 0.0347$ ;  $n = 7$ ). Basal plasma levels of VEGF were  $37.4 \pm 7.8$  pg/ml (mean  $\pm$  SE). Plasma VEGF



**Figure 1**  
Changes in plasma levels of endostatin before and after exercise at different time point in 7 healthy adults. The plasma endostatin concentrations were increased by 43% (\* $P = 0.0136$ ), 73% (\* $P = 0.004$ ), and 33% ( $P = 0.034$ ) at 0.5 h, 2 h, and 6 h after exercise, respectively, compared to the pre-exercise levels ( $20.3 \pm 3.2$  ng/ml, mean  $\pm$  SE).



**Figure 2**  
Oxygen consumption ( $VO_2$ ) during treadmill-exercise in relation to % increased plasma endostatin. The peak speed and the time spent at peak speed on the treadmill were  $4.85 \pm 0.99$  (mean  $\pm$  SD) miles per hour and  $6.86 \pm 2.76$  minutes ( $n = 7$ ; ranging 4–10 min), respectively. The total peak  $VO_2$  was considered as the product of peak  $VO_2$  and the time spent running at that peak. The % increased plasma endostatin after exercise ranged from 30% to 300% for different individual. There was a strong linear correlation between % increase in plasma levels of endostatin and the total peak  $VO_2$  ( $R = 0.969$ ;  $R^2 = 0.9388$ ;  $P < 0.01$ ).

levels decreased to  $28.3 \pm 6.4$ ,  $17.6 \pm 2.4$ , and  $26.5 \pm 12.5$  pg/ml, respectively, at 0.5, 2, and 6 h after treadmill-exercise. These values reflect percent changes of 24% ( $P = 0.159$ ), 53% ( $P = 0.035$ ), and 29% ( $P = 0.182$ ) at 0.5 h, 2 h, and 6 h after exercise, respectively, compared to the basal plasma levels. The regression analysis also indicated a good linear correlation between % decrease in plasma levels of VEGF and the total peak  $VO_2$  ( $R = 0.6410$ ). Basal levels of plasma bFGF (immediately before exercise) were detected in only 4 of 7 subjects using an assay (R&D, catalog number DFB50). The plasma levels of bFGF in those 4 subjects averaged  $6.3 \pm 0.5$  and  $6.8 \pm 0.8$  pg/ml, respectively, before and 2 h after exercise ( $P = 0.483$ ).

#### Correlation between Plasma Endostatin and VEGF Levels

Interestingly, regression analysis indicated a significant negative correlation between basal plasma endostatin and VEGF levels among the 7 male volunteers ( $R = 0.7235$ ;  $R^2 = 0.8510$ ;  $P = 0.015$ ), in which a higher endostatin level is associated with a lower VEGF level. A good linear correlation between % increase in endostatin and % decrease in VEGF levels was also found 2 h after exercise ( $R = 0.6541$ ;  $P = 0.0811$ ). These findings were consistent with the possibility that exercise may induce an angiostatic-phenotype (induction of endostatin and reduction of VEGF) in circulation of humans.

#### Discussion

The present study indicates that detectable amounts of endostatin are present in the plasma of healthy subjects. Basal plasma endostatin levels were  $20.3 \pm 3.2$  ng/ml (ranging 10.3 to 29.6 ng/ml in males). These results are consistent with other reports using a similar assay in which median serum endostatin levels were 13.8 ng/ml (ranging 11.1 to 15.4 ng/ml) in healthy male subjects [17]. The circulating form of human endostatin has also been detected by other methods such as Western blot [17] and mass spectrometry [18]. These basal levels of endostatin may be generated as a by-product of physiological collagen turnover. The presence of endostatin in the circulation of healthy subjects suggests that angiostatic factors may play an important role in the homeostatic regulation of angiogenesis under a normal condition [13].

Feldman et al [17] using the same endostatin assay (Cytimmune Sciences Inc.; College Park, MD) showed that the immunoreactivity of endostatin detected in normal human serum and plasma is essentially identical to that of recombinant endostatin. However, the functional status of circulating endogenous endostatin in humans remains unclear. Further studies are needed to determine whether circulating endogenous endostatin or what levels of endostatin can have a physiological function.



To our knowledge, the present study is the first to demonstrate that circulating endostatin can be significantly increased by exercise in proportion to the peak oxygen consumption under physiological conditions. Although the mechanism of endostatin release remains unclear, many studies have shown that the proteolytic release of endostatin from collagen XVIII is mediated by proteases of many classes, such as cysteine proteases, matrix metalloproteases, and aspartic proteases [19,20]. Many of these proteases are associated with physiological collagen turnover that could be enhanced by physical exercise [21,22]. Therefore, we can speculate that exercise-induced endostatin release is associated with a higher collagen turnover rate.

Another mechanism of endostatin release may involve activation and release of extracellular matrix proteases associated with the angiogenic process. Many *in vivo* studies have demonstrated that exercise induces angiogenesis in cardiac [23] and skeletal muscles [24]. It is therefore conceivable that these proteases are also responsible for releasing endogenous angiostatic factors such as endostatin. Furthermore, exercise may alter the binding characteristics of endostatin in metabolically active tissues and may increase blood flow to these tissues. These conditions may wash endostatin into the general circulation. Our preliminary data suggest that 3 weeks of exercise-training can significantly decrease endostatin levels in rat tibialis anterior muscle and increase circulating endostatin levels (unpublished observations). This latter finding supports our hypothesis that exercise-induced circulating endostatin may be derived primarily from skeletal and cardiac muscles. However, further studies are needed to investigate mechanisms of exercise-induced endostatin release.

It is well-known that angiogenesis is often a compensatory response to a prolonged imbalance between the metabolic requirements of the tissues and the perfusion capabilities of the vasculature [25]. Alteration in the expression of angiogenic factors, such as VEGF and bFGF, in tissues or circulation of the subjects following exercise, has been observed in animals [24,26] and humans [27-31]. Several human studies [27,29] have shown that exercise causes a transient decrease in circulating VEGF levels, while exercise increases VEGF expression in human skeletal muscle [30,31]. The present study confirms these previous reports and further shows that the transient decrease in circulating VEGF levels caused by exercise in healthy volunteers is proportional to the total peak oxygen consumption. The transient decrease in circulating VEGF levels caused by exercise in healthy adults does not necessarily mean that exercise can cause down-regulation of VEGF in the local muscle [29,30].

The mechanism responsible for the transient decrease in circulating VEGF caused by exercise is poorly understood. However, possible explanations might be as follows: 1) increased VEGF binding-affinity to its receptors at the endothelium, which would stimulate angiogenesis in the local tissues such as heart and skeletal muscles, and 2) a substantial increase in circulating VEGF binding proteins, which would protect the vascular system from a deleterious increase in VEGF-induced hyperpermeability [29,32].

In the present study, we have found that acute exercise caused a significant increase in circulating endostatin levels. Moreover, the highest induction of endostatin in circulation after treadmill exercises was observed in a subject who was a triathlon athlete and performed the greatest intensity of exercise. In addition, as mentioned above, our preliminary data suggest that 3 weeks of exercise-training can significantly decrease endostatin levels in the rat tibialis anterior muscle and increase circulation endostatin levels. Therefore, it is likely that exercise can increase endostatin in circulation acutely as well as chronically. However, further studies are needed for evaluating the long-term effect of exercise on increasing circulatory endostatin levels.

Angiogenesis appears to have both beneficial and deleterious effects in atherosclerosis. Whereas increased angiogenesis in the heart tissue may be a favorable sign in the healing of the ischemic tissues [35], progressive angiogenesis in a primary atherosclerotic lesion could be a cause of plaque expansion [33,34]. Our previous studies [24] as well as those from other laboratories have shown that exercise induces a local angiogenic phenotype characterized by over-expression of VEGF in skeletal muscle [27,29-31] and heart [35]. This local induction of an angiogenic phenotype by exercise appears to stimulate angiogenesis and thereby prevent ischemia in these tissues. As mentioned before, endostatin is an endogenous angiostatic factor that can inhibit the progression of atherosclerosis in a ApoE-deficient mouse model by reducing intimal and plaque tissue neovascularization [15]. Therefore, exercise can also exert a beneficial effect against atherosclerosis by increasing circulating endostatin that may inhibit development of atherosclerotic plaque through blocking angiogenesis in the plaque tissue.

## Conclusions

In conclusion, the present study shows that detectable amounts of endostatin are present in the plasma of healthy subjects and that circulating endostatin levels can be significantly increased by exercise. The magnitude of increased circulating endostatin appears to be proportional to the severity of exercise as assessed by total peak oxygen consumption. In the present study, exercise caused a transient decrease in circulating VEGF levels and did not

change plasma bFGF levels. These findings may provide new insights into the molecular links between physical-inactivity and the risk of angiogenesis-dependent diseases such as atherosclerosis.

## Methods

### Selection of Subjects

Seven healthy-male research personnel at University Mississippi Medical Center (UMMC) participated in the study (ages ranging from 18–49 years). The subjects were selected based on the absence of a history of malignancy, coronary heart disease, peripheral vascular disease, and hypertension. All subjects had different physical activity backgrounds including one who was a triathlon athlete and an individual who did little leisure-time physical activity. In addition, all subjects were non-smokers and abstained from alcohol consumption for 24 hours prior to the study. Informed consent was obtained from all subjects. The study protocol was approved by the Institutional Review Board of UMMC.

### Exercise Study Protocol

The exercise was performed on a treadmill according to a modified Ellestad Protocol [16]. Briefly, each individual started the treadmill exercise at a speed of 2–3 mph at a fixed grade of 15%. The speed was increased in stages of 0.5–1.0 mph to a peak speed of 4.0–6.5 mile per hour (mph), each stage taking 1–3 min. Each individual ran on the treadmill at peak speed for 4–10 minutes. The subjects were monitored by ECG during the exercise. Termination of exercise was based on attainment of 80–93% of maximal predicted heart rate and the tolerance of each individual. All volunteers did not have any food consumption until 6 h after exercise.

### Measurement of Plasma Levels of Endostatin, VEGF, and bFGF

Three-ml of blood were collected by venipuncture-tube with EDTA solution immediately before and 0.5 h, 2 h, and 6 h after exercise. The blood samples were immediately centrifuged at 700 × g in a micro-centrifuge for 5 minutes at 4°C; and the plasma was stored at -70°C. Plasma levels of endostatin (ng/ml) were measured using human endostatin ELISA kits (Cytimmune Sciences Inc.; College Park, MD) according to manufacturer protocol. Plasma levels of VEGF or bFGF were determined using human ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN).

### Estimation of Oxygen Consumption

Oxygen consumption ( $\text{VO}_2$ ) was estimated by the following equation [16]:  $\text{VO}_2 = V \times W \times (0.073 + \text{OC}/100) \times 1.8$  ( $\text{VO}_2$  = oxygen consumption in ml/min [standard temperature and pressure dry]; V = treadmill speed in m/min; W = body weight in kg; OC = treadmill angle in percent; 1.8 = factor constituting the oxygen requirement in ml/min

for 1 m/kg of work). This equation is applicable to a treadmill program, which gives a rough estimate of oxygen consumption at any speed and grade. In addition, this mathematical estimation provides values of oxygen consumption similar to those obtained from direct measurements when using treadmill exercise protocol [16]. The peak  $\text{VO}_2$  (L/min) was estimated by calculation of  $\text{VO}_2$  when the individual exercised at peak speed. The total peak  $\text{VO}_2$  (L) was considered as the product of peak  $\text{VO}_2$  and the time spent running at the peak level. The peak oxygen pulse (ml  $\text{O}_2$ /beat) was calculated as the quotient of peak  $\text{VO}_2$  (L/min) and peak heart rate (beats/min) during exercise.

### Statistical Analysis

Where indicated, data is presented as mean ± SE. Statistical significance was defined as a two-tail Student's t-test value of  $P < 0.05$ . Paired Student's t-test was used to compare variables between two groups (before and during or after exercise). Linear-regression was performed to assess the relationships between two continuous variables. All statistical calculations were performed with SigmaStat software (Jandel Corporation, San Rafael, CA).

### Authors' contributions

JWG carried out the design of the study, drafted and edited the manuscript. GG reviewed and edited the manuscript. JW and JWC carried out the immunoassays. JWC, IM, and THA participated in the exercise study. JWC, JW, and IM performed the statistical analysis, and data interpretation. JW, IM, and THA conceived of the study and the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

This study was supported by an American Heart Association Mississippi Affiliate Grant (9819183MS), by an American Cancer Society Institutional Research Grant (IRG-98-275-01), and by a National Heart, Lung, and Blood Institute Grant (HL-51971).

### References

- Booth FW, Gordon SE, Carlson CJ, Hamilton MT: **Waging war on modern chronic disease: primary prevention through exercise.** *J Appl Physiol* 2000, **88**:774-787.
- Francis K: **The burden of physical inactivity and cardiovascular heart disease.** *Compr Ther* 1998, **24**:87-92.
- Manson JE, Hu FB, Rich-Edwards JW, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Speizer FE, Hennekens CH: **A prospective study of walking compared with vigorous exercise in the prevention of coronary heart disease in women.** *N Engl J Med* 1999, **341**:650-658.
- Berlin JA, Colditz GA: **A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease.** *Am J Epidemiol* 1990, **132**:612-628.
- Wannamethee SG, Shaper AG: **Physical activity in the prevention of cardiovascular disease: an epidemiological perspective.** *Sports Med* 2001, **31**:101-114.
- Tan KH, de Cossart L, Edwards PR: **Exercise training and peripheral vascular disease.** *Br J Surgery* 2000, **87**:553-562.
- Sacco RL, Benjamin EG, Broderick JP: **Risk factors (AHA conference proceedings).** *Stroke* 1997, **28**:1507-1517.

8. O'Brien ER, Garvin MR, Dev R, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Folkman J: **Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques.** *Am J Pathol* 1994, **145**:883-94.
9. Isner JM: **Cancer and atherosclerosis: the broad mandate of angiogenesis.** *Circulation* 1999, **99**:1653-1655.
10. Kahlon R, Shapero J, Gotlieb AI: **Angiogenesis in atherosclerosis.** *Can J Cardiol* 1992, **8**:60-64.
11. Walsh K, Isner JM: **Apoptosis in inflammatory-fibroproliferative disorders of the vessel wall.** *Cardiovasc Res* 2000, **45**:756-765.
12. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS: **Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance.** *Nature* 1997, **390**:404-7.
13. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J: **Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth.** *Cell* 1997, **88**:277-285.
14. Obeso J, Weber J, Auerbach R: **A hemangioendothelioma-derived cell line: its use as a model for the study of endothelial cell biology.** *Lab Invest* 1990, **63**:359-69.
15. Moulton KS, Heller E, Folkman J: **Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice.** *Circulation* 1999, **99**:1726-32.
16. Elastad MH: **Stress testing protocol.** In: *Stress Testing: Principles and Practice* Edited by: Elastad MH. Philadelphia, PA: F. A Davis Company; 1996.
17. Feldman AL, Tamarkin L, Paciotti GF et al.: **Serum endostatin levels are elevated and correlate with serum vascular endothelial growth factor levels in patients with stage IV clear cell renal cancer.** *Clin Cancer Res* 2000, **6**:4628-4634.
18. Standker L, Schrader M, Kanse SM, Jurgens M, Forssmann WG, Preissner KT: **Isolation and characterization of the circulating form of human endostatin.** *FEBS Lett* 1997, **420**:129-133.
19. Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR, Delaisse J-M: **Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases.** *FEBS Lett* 2000, **486**:247-251.
20. Saarela J, Rehn M, Oikarinen A, Autio-Harminen H, Pihlajaniemi T: **The short and long forms of type XVIII collagen show clear tissue specificities in their expression and location in basement membrane zones in human.** *Am J Pathol* 1998, **153**:611-26.
21. Kovanen V, Suominen H: **Age- and training-related changes in the collagen metabolism of rat skeletal muscle.** *Eur J Appl Physiol* 1989, **58**:765-771.
22. Thomas DP, McCormick RJ, Zimmerman SD, Vadlamudi RK, Gosselin LE: **Aging- and training-induced alterations in collagen characteristics of rat left ventricle and papillary muscle.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1992, **263**:H778-H783.
23. White FC, Bloor CM, McKirnan MD, Carroll SM: **Exercise training in swine promotes growth of arteriolar bed and capillary angiogenesis in heart.** *J Appl Physiol* 1998, **85**:1160-1168.
24. Hang J, Kong L, Gu J-W, Adair TH: **VEGF gene expression is upregulated in electrically stimulated rat skeletal muscle.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1995, **269**:H1827-31.
25. Adair TH, Gay WJ, Montani J-P: **Growth regulation of the vascular system: evidence for a metabolic hypothesis.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1990, **259**:R393-R404.
26. Breen EC, Johnson EC, Wagner H, Tseng HM, Sung SA, Wagner PT: **Angiogenic growth factor mRNA responses in muscle to a single bout of exercise.** *J Appl Physiol* 1996, **81**:355-361.
27. Asano M, Kaneoka K, Nomura T, Asano K, Sone H, Tsurumaru K, Yamashita K, Matsuo K, Suzuki H, Okuda Y: **Increase in serum vascular endothelial growth factor levels during altitude training.** *Acta Physiol Scand* 1998, **162**:455-459.
28. Gu J-W, Santiago D, Olowe Y, Weinberger J: **Basic fibroblast growth factor as a biochemical marker of exercise-induced ischemia.** *Circulation* 1997, **95**:1156-68.
29. Gunga H-C, Kirsch K, Rocker L, Behn C, Koralewski E, Davila EH, Estrada MI, Johannes B, Wittels P, Jelkmann W: **Vascular endothelial growth factor in exercising humans under different environmental conditions.** *Eur J Appl Physiol* 1999, **79**:484-90.
30. Gustafsson T, Puntschart A, Kaijser L, Jansson E, Sundberg CJ: **Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999, **276**:H679-H685.
31. Richardson RS, Wagner H, Mudaliar RSD, Saucedo E, Henry R, Wagner PD: **Exercise adaptation attenuates VEGF gene expression in human skeletal muscle.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000, **279**:H772-H778.
32. Anthony FW, Evans PW, Wheeler T, Wood PJ: **Variation in detection of VEGF in maternal serum by immunoassay and the possible influence of binding proteins.** *Ann Clin Biochem* 1997, **34**:276-280.
33. Celletti FL, Hilfiker PR, Ghafouri P, Dake MD: **Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor 165 on progression of atherosclerotic plaque.** *J Am Coll Cardiol* 2001, **37**:2126-2130.
34. Lemstrom KB, Krebs R, Nykanen AI, Tikkanen JM, Sihvola RK, Aaltola EM, Hayry PJ, Wood J, Alitalo K, Vla-Herttuata S, Koskinen PK: **Vascular endothelial growth factor enhances cardiac allograft arteriosclerosis.** *Circulation* 2002, **105**:2524-2530.
35. Isner JM, Losordo DW: **Therapeutic angiogenesis for heart failure.** *Nat Med* 1999, **5**:491-492.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:

[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)



## ANEXO 5

### Ambulatório de Hipertensão Gestacional

O Ambulatório de Nefrologia / Hipertensão Gestacional é vinculado às atividades docentes do grupo de Nefrologia do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da PUCRS e também ao Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, área de Concentração em Nefrologia. Essa atividade é coordenada pelo Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo no conjunto 306 do Hospital São Lucas da PUCRS.

A atividade desenvolvida pelo aluno Giovani Gadonski consiste na preceptoria e orientação dos acadêmicos de medicina na assistência às pacientes que apresentaram quadro de doença hipertensiva ligada à gestação e foram atendidas no Centro Obstétrico do Hospital São Lucas, PUCRS. As pacientes têm sido encaminhadas do referido centro para acompanhamento ambulatorial crônico a fim de observar e assistir aos desfechos clínicos apresentados após a alta hospitalar. Para tanto, foi desenvolvido um protocolo de atendimento inicial e consulta de retorno, em colaboração com a Dra. Ioná Conceição e os alunos de iniciação científica, revisto pelo orientador, que tem como objetivo instruir os alunos na busca das informações mais relevantes (Anexo 7, página 138). Os dados coletados são armazenados no programa Access, em planilha desenvolvida pelo aluno, que gera tabela no programa Excel (Microsoft Corp).

O referido ambulatório iniciou suas atividades obedecendo ao protocolo descrito em 21 de Novembro de 2003. Até o presente momento, foram

atendidas 110 pacientes (primeiras consultas), sendo revistas em consultas regulares, totalizando o número de 357 retornos. Os dados coletados foram utilizados para investigações desenvolvidas pelos alunos de iniciação científica, sendo apresentados no Salão de Iniciação Científica da PUCRS. Adicionalmente, os alunos do Programa de Pós-graduação ligados ao laboratório de Nefrologia têm utilizado esses dados para elaboração das teses e dissertações.

Nesse período, foram desenvolvidas atividades complementares com os alunos envolvendo discussões dos casos, revisão da literatura em forma de seminários, protocolos e orientação em pesquisas. Essa atividade é reconhecida como Estágio de Docência.

## ANEXO 6

## Produção Científica

## Artigos completos publicados em periódicos

1. Gadonski G, LaMarca BB, Sullivan E, Bennett W, Chandler D, Granger JP. Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of interleukin 6. *Hypertension* 2006;48(4):711-6.

2. Gu JW, Gadonski G, Wang J, Makey I, Adair TH . Exercise increases endostatin in circulation of healthy volunteers. *BMC Physiol* 2004;4:2.

## Resumos publicados em anais de congressos

1. Ambros M, Schroeder AT, Fay AP, Martins-Costa G, Maffazioli G, Conceição I, Barreiro F, Alexandretti M, Nalepinski M, Farinon R, Bisinela F, Hoffmann K, Gadonski G, d'Avila DO, Pinheiro da Costa BE. Nefropatia de refluxo em mulheres com doença hipertensiva gestacional [abstract]. In: XXIII Congresso Brasileiro de Nefrologia. Gramado. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 2006;28. p 148.

2. Pinheiro da Costa BE, LaMarca BB, Bisinela F, Hoffmann K, Gadonski G, Conceição I, d'Avila DO, Antonello ICF, Granger JP, Poli de Figueiredo CE. Perfil de Citocinas Materna e da Placenta na Pré-eclâmpsia [abstract]. In: XIII Congresso Brasileiro de Nefrologia, 2006, Gramado. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 2006;28. p 28.

3. Pinheiro da Costa BE, LaMarca BB, Hoffmann K, Bisinela F, Gadonski G, Conceição I, Granger JP, d'Avila DO, Antonello ICF, Poli de Figueiredo CE. Citocinas Maternas e Fetais na Pré-eclâmpsia [abstract]. In: XIII Congresso Brasileiro de Nefrologia, 2006, Gramado. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 2006;28. p 29.

4. Conceição I, Ambros M, Schroeder AT, Fay AP, Martins-Costa G, Maffazioli G, Barreiro F, Alexandretti M, Nalepinski M, Farinon R, Bisinela F, Hoffmann K, Gadonski G, d'Avila DO, Pinheiro da Costa, BE. Doença Hipertensiva Gestacional e Influxo de Eritrocitário de L-Arginina [abstract]. In: XXIII Congresso Brasileiro de Nefrologia, 2006, Gramado. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 2006;28. p 30.

5. Gadonski G, Alexander BT, Granger JP. Effect of L-NIO on renal hemodynamic changes during pregnancy [abstract]. *Journal of Hypertension*, 2004;22(Suppl I). p S 90.

6. LaMarca BB, Gadonski G, Cockrell K, Sullivan E, Granger JP. Endothelin type A receptor blockade attenuates TNF alpha-induced hypertension in pregnant rats [abstract]. *FASEB Journal*, 2004;18. Abstract nr 6440.

7. Gu JW, McDonnell P, Gadonski G. Exercise induces angiogenesis, down-regulation of endostatin and up-regulation of vascular endothelial growth factor in the rat skeletal muscles [abstract]. *FASEB Journal*, 2004;18. Abstract nr 492.

8. Gu JW, Kodali M, Purser A, McDonnell P, Gadonski G. High salt diet induces hypertension and alters renal cytokine gene expression profiles in Sprague-Dawley rats [abstract]. *FASEB Journal*, 2004;18. Abstract nr 520.

9. Gadonski G, LaMarca BB, Bennett W, Granger JP. Physiological elevations in plasma levels of interleukin-6 increase arterial pressure in pregnant rats [abstract]. *FASEB Journal*, 2004;18. Abstract nr 6727.

10. Pinheiro da Costa BE, LaMarca B, Fournier L, Bisinela FP, Gadonski G, Poli de Figueiredo CE, Granger JP. Maternal plasma and placental cytokine profile in pré-eclâmpsia [abstract]. *J Clin Hypert*. 2006;8(5).



## Participação em Eventos

1. XXIII Congresso Brasileiro de Nefrologia. Papel da Interleucina-6 no Controle da Pressão Arterial em Resposta a Reduções na Pressão de Perfusão Uterina. 2006.

2. A Estruturação e o Gerenciamento de um Centro de Pesquisa como Fatores de Sucesso no Desempenho Científico e Performance Administrativa. Curso em Estruturação e Gerenciamento de Centro de Pesquisa como Fatores de Sucesso no Desempenho Científico e Performance Administrativa. 2005.

3. Mayo PUCRS Nefrologia 2005. Simpósio da PUCRS com a Clínica Mayo. 2005.

4. 20th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension. Congresso da Sociedade Internacional de Hipertensão. 2004.

5. Mayo PUC-RS. Simpósio da PUCRS com a Clínica Mayo. 2004.

6. II Curso de Fisiopatologia da FFFCMPA. Curso de Extensão em Fisiologia. 2004.

7. XV Scientific Meeting of the Inter-American Society of Hypertension and Council for High Blood Pressure Research. XV Scientific Meeting of the Inter-American Society of Hypertension and Council for High Blood Pressure Research. 2003.



1. Antes da gestação  
 2. Antes da 20ª semana de gestação  
 3. Após a 20ª semana de gestação  
 8. Não se aplica

05. História da gestação atual: Idade gestacional: \_\_\_\_\_ sem. (DUM) \_\_\_\_\_ sem. (Eco com \_\_\_ Sem.)  
 Pré-natal: 1. Sim 2. Não  
 8. Não se aplica
06. Puerpério: 1. Sim 8. Não se aplica (*Vá para a pergunta 17*)

Dados do parto: Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

07. Idade gestacional no parto: \_\_\_\_\_ sem. (DUM) \_\_\_\_\_ sem. (Eco com \_\_\_\_\_ sem.)  
 08. Tipo de parto: 1. Normal 2. Cesáreo por: \_\_\_\_\_  
 09. Amamentação: 1. Sim 2. Não

- Dados do RN: 10. Gênero: 1. Masculino 2. Feminino  
 11. Idade gestacional obstétrica: \_\_\_\_ sem 12. Idade gestacional pediátrica: \_\_\_\_ sem  
 13. APGAR: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
 14. 1. PIG 2. AIG 3. GIG  
 15. Peso do RN: \_\_\_\_\_ g 16. Peso da placenta: \_\_\_\_\_ g

17. A paciente teve pressão alta durante alguma gravidez?  
 1. Sim 2. Não 8. Não se aplica  
 9. Não sabe

18. A paciente permaneceu com a pressão alta após a gestação?  
 1. Sim 2. Não 8. Não se aplica  
 9. Não sabe

19. Que medicamentos para a pressão alta está usando?

NOME COMERCIAL	NOME FARMACOLÓGICO	CÓDIGO	DOSE	INTERVALO DE DOSE
1. _____	_____	_____	_____	_____
2. _____	_____	_____	_____	_____
3. _____	_____	_____	_____	_____

20. Que medicamentos usou anteriormente para a pressão?

NOME COMERCIAL	NOME FARMACOLÓGICO	CÓDIGO	DOSE	INTERVALO DE DOSE
1. _____	_____	_____	_____	_____
2. _____	_____	_____	_____	_____
3. _____	_____	_____	_____	_____

21. Assinale os motivos para o abandono:

1. Efeitos adversos 4. O médico mandou parar 8. Não se aplica  
 2. Custo 5. Achou que a pressão baixou demais 9. Não se lembra

3. Achou que estava curado

6. Outro: \_\_\_\_\_

22. Houve recomendação de tratamento não-farmacológico prévio?

- |                        |  |                  |
|------------------------|--|------------------|
| 1. Não houve           | 5. Diminuir sal da comida                | 11. Parar ACO    |
| 2. Parar de fumar      | 6. Diminuir as gorduras animais          | 12. Outra: _____ |
| 3. Diminuir as bebidas | 7. Diminuir o peso                       | 8. Não se aplica |
| 4. Fazer exercícios    | 10. Aumentar ingestão de frutos/verduras | 9. Não se lembra |

23. Quais das medidas recomendadas o paciente segue?

- |                        |  |                  |
|------------------------|--|------------------|
| 1. Não houve           | 5. Diminuir sal da comida                | 11. Parar ACO    |
| 2. Parar de fumar      | 6. Diminuir as gorduras animais          | 12. Outra: _____ |
| 3. Diminuir as bebidas | 7. Diminuir o peso                       | 8. Não se aplica |
| 4. Fazer exercícios    | 10. Aumentar ingestão de frutos/verduras | 9. Não se lembra |

se lembra

13. Nenhuma

*Se paciente for ♂ vá para a pergunta 20.*

24. A paciente já esteve grávida? 1. Sim 2. Não

25. Quantas vezes? 1. \_\_\_\_\_ 8. Não se aplica

26. Quantos filhos nasceram vivos? 1. \_\_\_\_\_ 8. Não se aplica

27. A paciente faz ou fez anticoncepção? 1. Sim 2. Não (*Vá para a pergunta 20*)  
8. Não se aplica

28. Que método emprega ou empregou?

- |                  |                  |                 |
|------------------|------------------|-----------------|
| 1. Tabela        | 3. Pílula: _____ | 5. Diafragma    |
| 2. Camisinha     | 4. DIU           | 6. Outro: _____ |
| 8. Não se aplica |                  |                 |

29. Se usa ou usou pílula, por quanto tempo (desconte interrupções)?

- |                                |                    |                       |
|--------------------------------|--------------------|-----------------------|
| 1. Menos de 6 meses            | 4. De 3 - 5 anos   | 7. Há 20 anos ou mais |
| 2. De 6 meses a menos de 1 ano | 5. De 5 - 10 anos  | 8. Não se aplica      |
| 3. De 1 ano a menos de 3 anos  | 6. De 10 - 20 anos | 9. Não sabe           |

30. Revisão de sistemas:

- |                   |                  |                |             |
|-------------------|------------------|----------------|-------------|
| 1. Retina: _____  |                  |                |             |
| 2. Coração:       | 1. Precordialgia | 2. Palpitações | 3. Dispnéia |
|                   |                  |                | 4. _____    |
| 3. Rim:           | 1. Hematúria     | 2. Proteinúria | 3. _____    |
| 4. Cérebro: _____ |                  |                |             |

31. Na família biológica do paciente tem alguém com pressão alta?

0. Ninguém      2. Mãe      4. Tios      6. Filhos      8. Não se aplica  
1. Pai      3. Irmãos      5. Avós      7. Primos      9. Não sabe

32. Na família biológica alguém teve provável infarto do miocárdio, AVC ou morte súbita antes dos 60 anos?

0. Ninguém      2. Mãe      4. Tios      6. Filhos      8. Não se aplica  
1. Pai      3. Irmãos      5. Avós      7. Primos      9. Não sabe

33. Na família biológica alguém teve provável pressão alta na gravidez?

0. Ninguém      2. Tias      4. Avós      8. Não se aplica  
1. Mãe      3. Irmãs      5. Primas      9. Não sabe

34. O paciente fuma?      1. Sim      2. Não      3. Não fuma mais, parou há \_\_\_meses \_\_\_\_anos

35. O paciente tem alguma atividade física regular?

1. Não tem atividade      3. Corre regularmente      5. Outra: \_\_\_\_\_  
2. Caminha regularmente      4. Tem atividade física associada ao trabalho

36. O paciente costuma tomar bebidas alcoólicas?      1. Sim      2. Não

37. Anote outros diagnósticos estabelecidos anotados no prontuário:

DIAGNÓSTICO	DATA	CID	DIAGNÓSTICO	DATA	CID
1. _____	___/___/___	_____	_____	___/___/___	_____
2. _____	___/___/___	_____	_____	___/___/___	_____
3. _____	___/___/___	_____	_____	___/___/___	_____

38. Anote outras doenças que o paciente refere ter:

DIAGNÓSTICO	DATA	CID	DIAGNÓSTICO	DATA	CID
1. _____	___/___/___	_____	_____	___/___/___	_____
2. _____	___/___/___	_____	_____	___/___/___	_____
3. _____	___/___/___	_____	_____	___/___/___	_____

39. O paciente tem história de infecção urinária de repetição?

1. Sim      2. Não      8. Não se aplica      9. Não sabe

40. Se sim, quando?      1. Na infância      2. Na idade adulta

41. O paciente tem história de nefropatia do refluxo?

1. Sim      2. Não      8. Não se aplica      9. Não sabe

42. Que outros remédios usa atualmente?

	NOME COMERCIAL	NOME FARMACOLÓGICO	CÓDIGO	DOSE	INTERVALO DE DOSE
1.	_____	_____	_____	_____	_____
2.	_____	_____	_____	_____	_____
3.	_____	_____	_____	_____	_____

43. Quem é o principal responsável pela renda familiar?

1. O próprio paciente      3. A esposa/companheira      5. Outro: \_\_\_\_\_  
 2. O marido/ companheiro      4. Ambos      9. Não sabe

44. A renda familiar mensal estimada em salários mínimos é:

1. Até um salário      3. De três a dez salários      5. De vinte a cinquenta  
 2. De um a três salários      4. De dez a vinte salários      6. Mais de cinquenta

### DADOS DE EXAME FÍSICO

45. PRESSÃO ARTERIAL

Manguito: \_\_\_\_\_ cm

Início da consulta: **PA MS D:** \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ mmHg

**PA MS E:** \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ mmHg

**PA DL E:** \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ mmHg

Fim da consulta: **PA MS E ou DL E:** \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ mmHg

46. FREQUÊNCIA CARDÍACA: \_\_\_\_\_ bpm

47. PESO: \_\_\_\_\_ Kg

48: ALTURA: \_\_\_\_\_ cm

49: IMC: \_\_\_\_\_

50. CIRC BRAQUIAL: \_\_\_\_\_ cm

51. QUADRIL: \_\_\_\_\_ cm

52. CINTURA: \_\_\_\_\_ cm

53. Os pulsos carotídeos são:

1. Normais      2. Com sopro à D      3. Com sopro à E      4. Com sopro bilateral

54. Há sopros no precórdio?

1. Não há sopros      2. Com sopros

55. O ritmo cardíaco é:

1. Regular      2. Irregular, sugere extrassístolia  
 3. Irregular, sugere fibrilação atrial      4. Irregular inespecífico

56. Há turgência jugular a 45°?

1. Sim      2. Não

57. Há edema de membros inferiores?

1. Uma cruz em 4                      2. Duas                      3. Três                      4. Quatro  
5. Não há edema

58. Anote as anormalidades de semiologia respiratória:

1. Não há anormalidades                      4. Diminuição do MV à E                      7. Estertores  
2. Aumento do diâmetro AP                      5. Sibilos                      10. Outra: \_\_\_\_\_  
3. Diminuição do MV à D                      6. Roncos

59. Há massas palpáveis no abdômen?

1. Não                      3. Sim, sugere fígado aumentado  
2. Sim, sugere rins aumentados                      4. Sim, sugere baço aumentado  
5. Sim, outra: \_\_\_\_\_

60. A aorta é palpável no abdômen?

1. Não                      2. Sim, aparentemente normal                      3. Sim, sugere dilatação aneurismática

61. Há sopros no abdômen?

1. Não                      3. Sim, na altura da artéria renal E                      5. Sim, sobre as artérias ilíacas  
2. Sim, aorta                      4. Sim, na altura da artéria renal D                      6. Sim, outra: \_\_\_\_\_

62. Exame dos pulsos periféricos: anote os seguintes códigos:

1. Normais                      3. Ausente à E                      5. Diminuído à D                      7. Diminuídos bilateralmente  
2. Ausente à D                      4. Ausente bilat                      6. Diminuído à E                      10. Com sopro (femorais)  
Pulso braquial: \_\_ Pulso tibial anterior \_\_\_\_\_ Pulso femoral: \_\_ Pulso cubital: \_\_\_\_\_  
Pulso tibial posterior: \_\_\_\_\_ Pulso radial: \_\_\_\_\_

63. Anormalidades no exame neurológico:

1. Não há alterações                      4. Hemiparesia à E                      7. Distúrbio de equilíbrio  
2. Hemiplegia à D                      5. Hemiparesia à D                      10. Afasia/disfasia  
3. Hemiplegia à E                      6. Alterações de sens                      11. Alteração par craniano: \_\_\_\_\_  
12. Outra: \_\_\_\_\_

64. Anormalidades do fundo de olho:

1. Sem anormalidades                      3. Apagamento venoso                      5. Exsudatos                      7. Edema de papila  
2. Estreitamento art                      4. Repesamento venoso                      6. Hemorragias

## RESULTADO DOS EXAMES COMPLEMENTARES

65. Exame qualitativo de urina:

1. pH: \_\_\_\_                      6. Proteinúria: \_\_\_\_ +  
2. densidade: \_\_\_\_\_.                      7. Glicosúria: \_\_\_\_ +  
3. Sem alterações                      10. Cilindros granulosos: \_\_\_\_\_

4. Hematúria: \_\_\_ hem p/c      11. Cilindros hialinos: \_\_\_\_\_  
 5. Leucocitúria: \_\_\_ leuc p/c      12. Cilindros hemáticos: \_\_\_\_\_
66. Proteinúria/amostra: \_\_\_\_\_ mg/dL      67. Creatininúria/amostra: \_\_\_\_\_ mg/dL  
 Prt/Cr: \_\_\_\_\_      68. Creatininúria / 24 horas: \_\_\_\_\_ mg/24h  
 70. Creatinina: \_\_\_\_\_ mg/dL      71. Uréia: \_\_\_\_\_ mg/dL      72. \_\_\_\_\_  
 Potássio: \_\_\_\_\_ mEq/L
73. Glicemia em jejum: \_\_\_\_\_ mg/dL      74. Ácido úrico: \_\_\_\_\_ mg/dL  
 75. TGO: \_\_\_\_\_ UI/L      76. TGP: \_\_\_\_\_ UI/L  
 77. Colesterol total: \_\_\_\_\_ mg/dL      78. HDL colesterol: \_\_\_\_\_ mg/dL  
 79. LDL colesterol: \_\_\_\_\_ mg/dL      80. Triglicéridos: \_\_\_\_\_ mg/dL  
 81. Hematócrito: \_\_\_\_\_ %      82. Hemoglobina: \_\_\_\_\_ g/dL  
 83. Leucócitos: \_\_\_\_\_      1. Desvio à E      2. Desvio à D  
 84. Plaquetas: \_\_\_\_\_  
 85. ECG:
86. Rx tórax:

### LISTA DE PROBLEMAS

Anotar lesões em órgãos-alvo:

	<b>DIAGNÓSTICO</b>	<b>CID</b>
1.	_____	_____
2.	_____	_____
3.	_____	_____
4.	_____	_____
5.	_____	_____
6.	_____	_____
7.	_____	_____
8.	_____	_____
9.	_____	_____
10.	_____	_____



**CONDUTA**

A. Retorno à consulta em: \_\_\_\_\_ semanas.  
 \_\_\_\_\_ mês(es).

B. Encaminhado a outro ambulatório: \_\_\_\_\_.

C. Tratamento não-medicamentoso recomendado:

- |  |   |
|--|---|
| 1. Parar de fumar                      | 5. Aumentar a ingestão de frutos e verduras |
| 2. Tratar a obesidade                  | 6. Limitar a ingestão de álcool             |
| 3. Reduzir gorduras sat e carboidratos | 7. Realizar exercícios físicos dinâmicos    |
| 4. Reduzir a ingestão de sal           | 10. Substituir a anticoncepção hormonal     |

D. Tratamento medicamentoso recomendado:

NOME COMERCIAL	NOME FARMACOLÓGICO	CÓDIGO	DOSE	INTERVALO DE DOSE
1. _____	_____	_____	_____	_____
2. _____	_____	_____	_____	_____
3. _____	_____	_____	_____	_____
4. _____	_____	_____	_____	_____
5. _____	_____	_____	_____	_____

E. Exames solicitados:

- |   |  |
|---|--|
| 1. <input type="checkbox"/> Exame qualitativo de urina                  | 10. <input type="checkbox"/> Colesterol total, HDL e LDL |
| 2. <input type="checkbox"/> Proteinúria/amostra e Creatininúria/amostra | 11. <input type="checkbox"/> Hemograma                   |
| 3. <input type="checkbox"/> Proteinúria/ 24 horas                       | 12. <input type="checkbox"/> Plaquetas                   |
| 4. <input type="checkbox"/> Creatinina                                  | 13. <input type="checkbox"/> TSH e T4                    |
| 5. <input type="checkbox"/> Uréia                                       | 14. <input type="checkbox"/> ECG                         |
| 6. <input type="checkbox"/> Potássio                                    | 15. <input type="checkbox"/> Rx de tórax                 |
| 7. <input type="checkbox"/> Glicemia em jejum                           | 16. <input type="checkbox"/> Ecografia abdominal         |
| 8. <input type="checkbox"/> Ácido úrico                                 | 17. <input type="checkbox"/> Cintilografia com DMSA      |
| 9. <input type="checkbox"/> TGO e TGP                                   | 18. Outro: _____   |

DATA PREVISTA PARA O RETORNO A CONSULTA: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

RESPONSÁVEIS PELA COLETA DOS DADOS BÁSICOS: \_\_\_\_\_

**HOSPITAL SÃO LUCAS**  
**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**  
**AMBULATÓRIO DE DOENÇAS HIPERTENSIVAS**  
**FICHA CONSULTA DE RETORNO**

**IDENTIFICAÇÃO**

CASO Nº: \_\_\_\_\_ REGISTRO: \_\_\_\_\_ DATA DA CONSULTA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 NOME COMPLETO: \_\_\_\_\_

**DADOS DE HISTÓRIA**

01. Intercorrências: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

02. Aderência ao tratamento não-medicamentoso: 1. Sim 2. Não

03. Medicamentos em uso:

	NOME COMERCIAL	NOME FARMACOLÓGICO	CÓDIGO	DOSE	INTERVALO DE DOSE
1.	_____	_____	_____	_____	_____
2.	_____	_____	_____	_____	_____
3.	_____	_____	_____	_____	_____
4.	_____	_____	_____	_____	_____
5.	_____	_____	_____	_____	_____

04. Aderência ao tratamento medicamentoso: 1. Sim 2. Não

**DADOS DE EXAME FÍSICO**

05. PRESSÃO ARTERIAL Manguito: \_\_\_\_\_ cm  
 Início da consulta: **PA MS D:** \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ mmHg  
**PA MS E:** \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ mmHg  
**PA DL E:** \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ mmHg  
 Fim da consulta: **PA MS E ou DL E:** \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ mmHg

06. FREQUÊNCIA CARDÍACA: \_\_\_\_\_ bpm 07. PESO: \_\_\_\_\_ Kg  
 08: ALTURA: \_\_\_\_\_ cm 09: IMC: \_\_\_\_\_

10. O ritmo cardíaco é:

- |  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| 1. Regular                             | 2. Irregular, sugere extrassístolia |
| 3. Irregular, sugere fibrilação atrial | 4. Irregular inespecífico           |

11. Há turgência jugular a 45°? 1. Sim 2. Não

12. Há edema de membros inferiores?

1. Uma cruz em 4 2. Duas 3. Três 4. Quatro  
5. Não há edema

13. Anote as anormalidades de semiologia respiratória:

1. Não há anormalidades 4. Diminuição do MV à E 7. Estertores  
2. Aumento do diâmetro AP 5. Sibilos 10. Outra: \_\_\_\_\_  
3. Diminuição do MV à D 6. Roncos

14. Há massas palpáveis no abdômen?

1. Não 3. Sim, sugere fígado aumentado  
2. Sim, sugere rins aumentados 4. Sim, sugere baço aumentado  
5. Sim, outra: \_\_\_\_\_

15. A aorta é palpável no abdômen?

1. Não 2. Sim, normal 3. Sim, dilatação aneurismática

16. Há sopros no abdômen?

1. Não 3. Sim, na altura da art renal E 5. Sim, sobre as artérias ilíacas  
2. Sim, sobre a aorta 4. Sim, na altura da artrenal D 6. Sim, outra: \_\_\_\_\_

17. Exame dos pulsos periféricos: anote os seguintes códigos:

1. Normais 3. Ausente à E 5. Diminuído à D 7. Diminuídos bilateralm  
2. Ausente à D 4. Ausente bilateralmente 6. Diminuído à E  
10. Com sopro (femorais)

Pulso braquial: \_\_\_\_\_ Pulso tibial anterior: \_\_\_\_\_ Pulso femoral: \_\_\_\_\_

Pulso cubital: \_\_\_\_\_ Pulso tibial posterior: \_\_\_\_\_ Pulso radial: \_\_\_\_\_

18. Anormalidades no exame neurológico:

1. Não há alterações 4. Hemiparesia à E 7. Distúrbio de equilíbrio  
2. Hemiplegia à D 5. Hemiparesia à D 10. Afasia/disfasia  
3. Hemiplegia à E 6. Alterações de sensibilidade 11. Alteração par craneano: \_\_\_\_\_  
12. Outra: \_\_\_\_\_

19. Outras

Anormalidades: \_\_\_\_\_

---



---



---

## RESULTADO DOS EXAMES COMPLEMENTARES

20. Exame qualitativo de urina:

- |                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1. pH: _____                    | 6. Proteinúria: _____ +         |
| 2. densidade: _____             | 7. Glicosúria: _____ +          |
| 3. Sem alterações               | 10. Cilindros granulosos: _____ |
| 4. Hematúria: _____ hem p/c     | 11. Cilindros hialinos: _____   |
| 5. Leucocitúria: _____ leuc p/c | 12. Cilindros hemáticos: _____  |

- |                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| 21. Proteinúria/amostra: _____ mg/dL | 22. Creatininúria/amostra: _____ mg/Dl   |
| 23. Prt/Cr: _____                    | 24. Proteinúria / 24 horas: _____ mg/24h |
| 25. Creatinina: _____ mg/dL          | 26. Uréia: _____ mg/dL                   |
| 27. Potássio: _____ mEq/L            | 28. Glicemia em jejum: _____ mg/dL       |
| 29. Ácido úrico: _____ mg/dL         | 30. TGO: _____ UI/L                      |
| 31. TGP: _____ UI/L                  | 32. Colesterol total: _____ mg/dL        |
| 33. HDL colesterol: _____ mg/dL      | 34. LDL colesterol: _____ mg/dL          |
| 35. Triglicerídeos: _____ mg/dL      | 36. Hematócrito: _____ %                 |
| 37. Hemoglobina: _____ g/dL          | 38. Leucócitos: _____                    |
| 1. Desvio à E                        | 2. Desvio à D                            |
| 39. Plaquetas: _____                 |  |
| 40. TSH: _____ µg/dL                 | 41. T4: _____ µU/mL                      |
| 42. ECG: _____                       |  |

43. Rx tórax: \_\_\_\_\_

44. Ecografia abdominal total: \_\_\_\_\_

45. Ecografia vias urinárias: \_\_\_\_\_

46. Cintilografia com DMSA: \_\_\_\_\_

47. Outros: \_\_\_\_\_

## ANÁLISE

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**CONDUTA**

A. Retorno à consulta em: \_\_\_\_\_ semanas.  
 \_\_\_\_\_ mês (es).

B. Encaminhado a outro ambulatório: \_\_\_\_\_.

C. Tratamento não-medicamentoso recomendado:

- |                               |   |
|-------------------------------|---|
| 1. Parar de fumar             | 5. Aumentar a ingestão de frutos e verduras |
| 2. Tratar a obesidade         | 6. Limitar a ingestão de álcool             |
| 3. Reduzir gorduras saturadas | 7. Realizar exercícios físicos dinâmicos    |
| 4. Reduzir a ingestão de sal  | 10. Substituir a anticoncepção hormonal     |

D. Tratamento medicamentoso recomendado:

NOME COMERCIAL	NOME FARMACOLÓGICO	CÓDIGO	DOSE	INTERVALO DE DOSE
1. _____	_____	_____	_____	_____
2. _____	_____	_____	_____	_____
3. _____	_____	_____	_____	_____
4. _____	_____	_____	_____	_____
5. _____	_____	_____	_____	_____

E. Exames solicitados:

- |   |  |
|---|--|
| 1. <input type="checkbox"/> Exame qualitativo de urina                | 10. <input type="checkbox"/> Colesterol total, HDL e LDL |
| 2. <input type="checkbox"/> Proteinúria/amostra e Creatinúria/amostra | 11. <input type="checkbox"/> Hemograma                   |
| 3. <input type="checkbox"/> Proteinúria/ 24 horas                     | 12. <input type="checkbox"/> Plaquetas                   |
| 4. <input type="checkbox"/> Creatinina                                | 13. <input type="checkbox"/> TSH e T4                    |
| 5. <input type="checkbox"/> Uréia                                     | 14. <input type="checkbox"/> ECG                         |
| 6. <input type="checkbox"/> Potássio                                  | 15. <input type="checkbox"/> Rx de tórax                 |
| 7. <input type="checkbox"/> Glicemia em jejum                         | 16. <input type="checkbox"/> Ecografia abdominal         |
| 8. <input type="checkbox"/> Ácido úrico                               | 17. <input type="checkbox"/> Cintilografia com DMSA      |
| 9. <input type="checkbox"/> TGO e TGP                                 | 18. <input type="checkbox"/> Outro: _____                |

DATA PREVISTA PARA O RETORNO A CONSULTA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

RESPONSÁVEIS PELA COLETA DOS DADOS \_\_\_\_\_