

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

TRANSPORTE ERITROCITÁRIO DA L-ARGININA
PELOS SISTEMAS y^+ e y^+L NA
HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA,
GESTAÇÃO NORMAL E
COM DISTÚRBIOS HIPERTENSIVOS GESTACIONAIS

IONÁ ROSINE SCOLARI CONCEIÇÃO

Dissertação para postular título de Doutor sob orientação:
Dr^a Bartira Ercília Pinheiro da Costa
Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL
MARÇO DE 2007

Dados internacionais de Catalogação na publicação (CIP)

C744t Conceição, Ioná Rosine Scolari

Transporte eritrocitário da L-arginina pelos sistemas y^+ e y^+L na hipertensão arterial sistêmica, gestação normal e com distúrbios hipertensivos gestacionais / Ioná Rosine Scolari Conceição; orient. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo e Bartira Ercília Pinheiro da Costa. Porto Alegre: PUCRS, 2007.

176f.: 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. ARGININA. 2. HIPERTENSÃO. 3. HIPERTENSÃO INDUZIDA PELA GRAVIDEZ. 4. PRÉ-ECLÂMPsia. 5. ERITRÓCITOS/fisiologia. 6. ÓXIDO NÍTRICO. 7. SISTEMA Y^+ DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS. 8. MEMBRANA CELULAR/fisiologia. 9. DOENÇA CRÔNICA. 10. ESTUDOS TRANSVERSAIS. 11. ESTUDOS PROSPECTIVOS. I. Figueiredo, Carlos Eduardo Poli de. II. Costa, Bartira Ercília Pinheiro da. III. Título.

C.D.D. 618.3

C.D.U. 612.11:616.12-008.331.1(043.2)

N.L.M. WQ 244

FOMENTO

As fontes financiadoras deste trabalho foram:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
(FAPERGS)

Dedico este trabalho aos meus pais, **Menotes** e **Adelina**, por me escolherem para desfrutar de sua convivência e serem sempre exemplo de vida pra mim.

Ao meu irmão, **André**, que, mesmo longe, sempre teve uma palavra de incentivo e carinho, me impedindo de desistir desta árdua jornada.

Aos meus orientadores, **Poli** e **Bartira**, por serem as mãos que me guiaram até aqui com muita dedicação e competência.

À vocês, dedico toda minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

O resultado de um esforço conjunto tornou-se realidade concreta com este trabalho. Para isso foi fundamental o apoio de muitas pessoas que estiveram ao meu lado em todos os momentos deste período a quem, humildemente, mas de todo o meu coração, venho agradecer:

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e o Curso de Pós-graduação em Clínica Médica, que propiciaram toda minha formação acadêmica.

Aos fomentadores **FAPERGS, CAPES e CNPq** pelo apoio ao Laboratório de Nefrologia.

Ao **Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS**, pela oportunidade de convívio com a pesquisa clínica e laboratorial.

Ao **Hospital São Lucas da PUCRS e Laboratório de Patologia**, pelo auxílio durante a realização do estudo.

Aos professores, funcionários, residentes e acadêmicos dos **Serviços de Nefrologia e Obstetrícia do Hospital São Lucas da PUCRS**, pela colaboração na elaboração deste projeto.

Às **mulheres** que participaram deste estudo de maneira tão prestimosa tornando-o uma realidade.

Ao **Dr. Mário Bernardes Wagner** pela orientação na análise estatística dos dados.

Aos meus orientadores a quem nunca cansarei de agradecer:

Dr^a Bartira Ercília Pinheiro da Costa, exemplo de professora, competência profissional, mulher, mãe e, acima de tudo, amiga de todas as horas. Obrigada por existir, por estar na minha vida e ser o meu “porto seguro” nesses momentos difíceis.

Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo, meu mestre querido e amigo, que sabe nos guiar como ninguém pelos caminhos da ciência e nos impulsionar para obtermos o melhor. Desde os nossos primeiros contatos como acadêmica até hoje, quando concluo minha formação, és e sempre será meu exemplo maior de médico, colega, competência, honestidade e ser humano.

Às minhas colegas “de bancada” **Priscilla Barcellos de Almeida** e **Silvana Lunardini Alves**, por me auxiliarem logisticamente na realização do trabalho e pelo apoio incontestável nos momentos críticos.

Aos meus **colegas de PUCRS** pelas oportunidades de aprendizado e pelo carinho a mim dispensado.

Aos meus colegas de Servirim e hospital, especialmente **Dr. Fernando Grillo**, **Dr^a Rosana** Boucinha de Silva, **Dr. Ricardo** Soares Almeida, **Dr. Rodrigo** Motta e **Dr. Eduardo** Carvalho, pelos momentos agradáveis de convivência e por não medirem esforços para que eu pudesse concluir este projeto de vida.

Aos **funcionários da Servirim** – secretários, enfermeiras, técnicos e auxiliares de enfermagem - pela paciência a mim dispensada nesta fase conturbada da minha vida.

Aos alunos de iniciação científica – **André** Poils Fay, **Antonella** Furquim Conte, **Caroline** Schröer, **Daniele** Escouto, **Fabiane** Bisinela, **Florência** Ferreira Barreiro, **Gabriela** Martins-Costa, **Giovana** De Nardo Maffazioli, **João Paulo** Leal

Schambeck, **João Vicente** Matas Soles, **Kiele** Hoffmann, **Mateus** Alexandretti, **Márcia** Nalepinski, **Mariana** Ambros, **Marta** Hentschke, **Renata** Farinon – que me auxiliaram no contato com as pacientes e tornaram os nossos dias de convivência muito agradáveis e divertidos.

Às minhas amigas “blacks” – **Betina**, **Daniela**, **Fernanda**, **Maria Eugênia**, **Sônia** e **Tháise** – por me ensinarem o verdadeiro sentido da palavra amizade.

A **minha família**, pela confiança em mim depositada.

Ao meu namorado **Emerson**, que acompanhou pacientemente esta jornada final, e sempre me dedicou muito incentivo e amor.

A todos, o meu sincero **MUITO OBRIGADO!**

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XVI
LISTA DE TABELAS	XVII
RESUMO	XVIII
ABSTRACT	XX
INTRODUÇÃO.....	22
1. Gestação	23
2. Doença Hipertensiva Gestacional.....	24
2.1 Epidemiologia.....	24
2.2 Fatores de risco	25
2.3 Classificação.....	26
2.4 Caracterização.....	28
2.5 Etiopatogenia	31
3. Via L-arginina – NO.....	34
4. Transporte através da membrana celular.....	40
5. Transporte de L-arginina através da membrana celular.....	43
5.1 Sistema y ⁺	44
5.2 Sistema y ⁺ L.....	45
5.3 Cinética do transporte.....	46

6. Eritrócito como modelo celular em estudo de transporte transmembrana	48
7. A via L-arginina – NO e Doença Hipertensiva Gestacional	49
OBJETIVOS	52
1. Objetivo geral	52
2. Objetivos específicos	52
PACIENTES E MÉTODOS	53
1. Definições para o trabalho	53
2. Delineamento	56
3. Pacientes	56
3.1 Critério geral de inclusão das pacientes	56
3.2 Critérios de exclusão	57
4. Consentimento	57
5. Soluções e Reagentes	58
5.1 Solução salina	58
5.2 Solução de L-arginina	58
5.3 N-etilmaleimida	59
5.4 Líquido de cintilação	59
6. Procedimento	59
7. Influxo da L-arginina em eritrócitos	61
7.1 Influxo total	61
7.2 Influxo do y^+L	63
7.3 Exemplo de uma curva de influxo eritrocitário de L-arginina	63

8. Análise estatística	65
9. Considerações sobre a tese	65
10. Ambulatório de Hipertensão Gestacional	67
RESULTADOS	69
1. Características demográficas e clínicas.....	69
2. Reprodutibilidade	76
3. Captação eritrocitária da L-arginina	78
4. Correlações.....	83
DISCUSSÃO.....	85
CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
ANEXO 1.....	112
ANEXO 2.....	127
ANEXO 3.....	131
ANEXO 4.....	134
ANEXO 5.....	150
ANEXO 6.....	158
ANEXO 7.....	163

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
μmol	Micromol
^{14}C	Carbono quatorze
^{15}N	Nitrogênio quinze
Å	Angstrom
ABNT	Associação Brasileira de Normas e Técnicas
ADMA	<i>Asymmetric dimethyl arginine</i> (Dimetil L-arginina assimétrica)
AIG	Adequado para a idade gestacional
ATP	Adenosina trifosfato
AU	Ácido úrico
BAT	<i>Broad-scope amino acid transport proteins</i> (Proteína de transporte amplo de aminoácidos)
Ca^{+2}	Cálcio iônico
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	<i>Cationic amino acid transporter</i> (Proteína transportadora de aminoácidos catiônicos)
Céls	Células
CNPq	Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico
cpm_a	Cintilações por minuto de cada amostra
cpm_p	Cintilações por minuto do tubo padrão

CR	Creatinina
CV	Coefficiente de variação
DHG	Doença Hipertensiva Gestacional
DP	Desvio padrão
DUM	Data da última menstruação
E	Eclâmpsia
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial ou tipo III
EQU	Exame qualitativo de urina
f	Frequência
FAPERGS	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
FRDE	Fator relaxante derivado do endotélio (<i>endothelium-derived vascular relaxing factor</i>)
g	Gramas
g/dL	Gramas por decilitro
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GIG	Grande para a idade gestacional
GMP	Guanosina monofosfato
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GN	Gestante normal
GTP	Guanosina trifosfato
h	Hora
H ⁺	Hidrogênio
HA	Hipertensão arterial
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
Hb	Hemoglobina
HC	Hipertensão Crônica

Hct	Hematócrito
HELLP	Síndrome HELLP (<i>Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, Low Platelet</i>)
HG	Hipertensão Gestacional
HSL	Hospital São Lucas da PUCRS
IG	Idade gestacional
IGP	Idade gestacional pediátrica
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível ou tipo II
KCl	Cloreto de potássio
kg	Quilograma
k _m	Constante de meia-saturação
L	Litro
L-NAME	N ^G -nitro metil éster L-arginina
L-NMA	N ^G -metil-L-arginina
L-NMMA	N ^G -metil-L-arginina
min	Minuto
mg/dL	Miligrama por decilitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm ³	Milímetro cúbico
mmHg	Milímetro de mercúrio
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
MS-DOS	<i>Microsoft – Data Operacional System</i>
n	Tamanho da amostra
Na ⁺	Sódio

NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Dinucleotídeo adenina nicotinamida
NEM	<i>N</i> -etilmaleimida
NG	Não-gestante
NG/HAS	Não-gestante com hipertensão crônica
NG/N	Não-gestante normotensa
NHBPEPWG	<i>National High Blood Pressure Education Program Working Group</i>
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal ou tipo I
NO	<i>Nitric oxide</i> (Óxido nítrico)
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i> (Óxido nítrico sintase)
°C	Grau Celsius
p	Significância estatística
P/C	Relação proteinúria e creatininúria em amostra de urina
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PCMBS	Sulfonato de p-cloromercuriobenzeno
PE	Pré-eclâmpsia
PES	Pré-eclâmpsia sobreposta a hipertensão crônica
pH	Potencial de hidrogênio
PIG	Pequeno para idade gestacional
PIGF	Fator de crescimento placentário

POP	2,5 difeniloxazoli
POPOP	Fenil-2-oxazolil-benzeno
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RN	Recém-nascido
rpm	Rotação por minuto
seg	Segundo
sem	Semana
sFit1	Tirosina quinase 1 fms- <i>simile</i> solúvel
SPE	Síndrome de Pré-eclâmpsia
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SS	Solução salina
t	Teste <i>t</i> de Student
UI/L	Unidade internacional por litro
V_0	Velocidade inicial
V_{max}	Capacidade máxima de transporte
VEGF	Fator de crescimento endotelial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de formação do óxido nítrico derivado do endotélio.	38
Figura 2. Influxos de L-arginina total e nos sistemas de transporte y^+ e y^+L (curva hipotética).....	64
Figura 3. Reprodutibilidade dos ensaios em duplicata de influxos de L-arginina em eritrócitos de três mulheres não-gestantes.....	76
Figura 4. Capacidade máxima do transporte eritrocitário total e dos sistemas y^+ e y^+L da L-arginina - V_{max} ($\mu\text{mol/L}$ de céls/h) – nos grupos estudados: PE = pré-eclâmpsia (n=39); PES = pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica (n=8); HG = hipertensão gestacional (n=14); HC = hipertensão crônica (n=10); GN = grupo de gestantes normais (n=28); NG/HAS = não-gestantes com hipertensão crônica (n=20); NG = não-gestantes normotensas (n=18).....	80
Figura 5. Constante de meia saturação do transporte eritrocitário da L-arginina total e dos sistemas y^+ e y^+L - k_m ($\mu\text{mol/L}$) – nos grupos estudados: PE = pré-eclâmpsia (n=39); PES = pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica (n=8); HG = hipertensão gestacional (n=14); HC = hipertensão crônica (n=10); GN = grupo de gestantes normais (n=28); NG/HAS = não-gestantes com hipertensão crônica (n=20); NG = não-gestantes normotensas (n=18).....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das mulheres do estudo.	70
Tabela 2. Características demográficas e clínicas dos grupos estudados.	72
Tabela 3. Dados do parto e dos recém-nascidos das gestantes estudadas.....	75
Tabela 4. Reprodutibilidade dos influxos através da variação das constantes cinéticas de transporte (V_{max} e k_m) em três amostras de eritrócitos humanos.	77
Tabela 5. Capacidade máxima do transporte eritrocitário da L-arginina total e dos sistemas y^+ e y^+L - V_{max} - nas mulheres estudadas.....	79
Tabela 6. Avaliação da constante de meia saturação do transporte eritrocitário total e dos sistemas y^+ e y^+L da L-arginina - k_m - nas mulheres estudadas.....	81
Tabela 7. Coeficiente de correlação de Pearson dos parâmetros cinéticos - V_{max} ($\mu\text{mol/L}$ de céls/h) e k_m ($\mu\text{mol/L}$) - de influxo total e nos sistemas y^+ e y^+L - com dados clínicos na amostra estudada (n=137).	84

RESUMO

A L-arginina é o aminoácido precursor da síntese de óxido nítrico - um potente vasodilatador endógeno. Este aminoácido é transportado através da membrana celular por dois sistemas de transporte: y^+ e y^+L . A capacidade máxima de transporte eritrocitário total da L-arginina está aumentada na síndrome de pré-eclâmpsia (SPE), especialmente em pacientes previamente hipertensas com PE. A hipótese do presente estudo é que o aumento do transporte de L-arginina possa estar associado à hipertensão.

O objetivo foi avaliar a atividade dos transportadores da L-arginina - sistemas y^+ e y^+L - em eritrócitos de mulheres normotensas e hipertensas, gestantes controle e portadoras de distúrbios hipertensivos da gestação.

A amostra foi composta por 137 mulheres divididas nos seguintes grupos: 39 com pré-eclâmpsia (PE), 8 com pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica (PES), 14 com hipertensão gestacional (HG), 10 gestantes com hipertensão crônica (HC), 28 gestantes controle (GN), 20 mulheres não-gestantes hipertensas (NG/HAS) e 18 normotensas (NG/N). O influxo eritrocitário de L-arginina foi mensurado usando ^{14}C como marcador e *N*-etilmaleimida como inibidor do sistema de transporte y^+ para obter a função dos dois sistemas em separado. Os resultados foram submetidos à equação cinética de Michaelis-Menten para determinar a capacidade máxima de transporte (V_{max}) e a constante de meia-saturação (k_m).

Os resultados mostraram que não houve alteração no V_{\max} - do influxo total e do sistema y^+L . Os grupos PE, HG e GN apresentam a capacidade máxima de transporte pelo sistema y^+ menor que NG/N. A constante de meia saturação (k_m) não foi diferente entre os grupos.

ABSTRACT

L-arginine is the precursor of nitric oxide - a potent endogenous vasodilator. This amino acid is transported via two membrane transport systems: y^+ and y^+L . Total L-arginine erythrocyte maximal capacity is increased in preeclampsia syndrome, especially in hypertensive patients with superimposed preeclampsia. The hypothesis of the present study is that erythrocyte L-arginine transport is associated with hypertension.

The aim was to evaluate the activity of y^+ and y^+L erythrocyte membrane transport systems of L-arginine, in normotensive and hypertensive women, and women with and without the hypertensive disorders of pregnancy.

Sample was composed by 137 women divided into followed groups: 39 with preeclampsia (PE), 8 with superimposed preeclampsia (SPE), 14 with gestational hypertension (GH), 10 with chronic hypertension (CH), 28 pregnant controls (CP), 20 non-pregnant hypertensive (HAS) and 18 non-pregnant normotensive women (N). L-arginine erythrocyte uptake was measured using ^{14}C as a marker, and *N*-ethylmaleimide as y^+ transport system inhibitor to obtain the function of two transport systems separately. The results were submitted to Michaelis-Menten equation to determine the maximal capacity of transport (V_{max}) and half saturation constant (k_m).

Results showed no alteration in total and y^+L V_{max} . The maximal capacity of transport via y^+ system was lower in PE, GH and CP in comparison with

normotensive non-pregnant. Half saturation constant (k_m) had no difference between groups.

INTRODUÇÃO

Certeza

A gravidez
caiu na minha cabeça
como uma fruta madura

Puf.

E germinou, succulenta,
em todos os meus sentidos.

Pressenti-a num sono
petulante e teimoso...

Senti-a nos seios,
maiores e intumescidos.

Confirmei-a
nos exames de praxe.

Antes da decisão,
o pânico desmedido

Depois,
a vontade louca de conhecer Ana,
Mariana, Camila,
quijá Isabel.

Lucia Koury

1. Gestação

A gestação normal é caracterizada por modificações anatômicas e funcionais que preparam a mulher a esta nova condição, a qual pode ser considerada um teste de esforço ao organismo feminino (POLI DE FIGUEIREDO *et al*, 2003; WILLIAMS, 2003).

Essas modificações ocorrem através de dois processos adaptativos básicos: o metabólico-nutricional – que permite o crescimento do feto através do fornecimento de alimentação, e o circulatório – que supre o feto com oxigênio e nutrientes (BRANCH, 1992).

Inicialmente ocorre o processo de adaptação circulatória sistêmica, caracterizado por aumento do líquido extracelular intersticial e plasmático, por volta da sexta semana de gestação, atingindo cerca de 45% do volume pré-gravídico no final da gestação. Associado a isto ocorre aumento do débito cardíaco em torno de 43% e da frequência cardíaca em torno de 17% (CLARK *et al*, 1989).

O fluxo plasmático renal aumenta cerca de 75% e a filtração glomerular cerca de 50% durante a gestação normal, levando à queda nas concentrações de uréia, nitrogênio, creatinina e ácido úrico. Os níveis plasmáticos de renina, angiotensina II e aldosterona mantêm-se elevados em toda gestação (LINDHEIMER *et al*, 2001).

O comportamento da pressão arterial (PA) durante a gestação normal tem sido motivo de muitos estudos. Alguns autores descrevem que ocorre redução da pressão arterial, com seus menores valores por volta da vigésima semana, elevando-se após até o termo (MACGILLIVRAY *et al*, 1969; CUGINI *et al*, 1992). Ainda há descrições de pressões arteriais sistólicas e diastólicas mais elevadas no terceiro trimestre da gestação no nosso meio (LUTZKY, 1997). Outros autores descrevem um comportamento constante da pressão arterial (HALLIGAN *et al*,

1993; STELLA & GRELLA, 1996). Também existem evidências de que gestantes seriam resistentes a agentes vasopressores (GANT *et al*, 1974; CUNNINGHAM *et al*, 1975), o que pode ser atribuído a um aumento da produção de vasodilatadores e redução de constritores derivados do endotélio (PINTO *et al*, 1991; SHEPHERD & KATUSIC, 1991; KATUSIC & SHEPHERD, 1991; PASCOAL & UMANS, 1996; PODJARNY *et al*, 1997).

Mas antes mesmo do entendimento do papel do endotélio na gestação normal, a literatura específica está amplamente voltada para a solução e compreensão da implicação do endotélio na Doença Hipertensiva Gestacional (DHG), a mais freqüente das patologias da gestação.

2. Doença Hipertensiva Gestacional

A Doença Hipertensiva Gestacional é uma patologia freqüente e está associada com elevados índices de morbi-mortalidade materna e fetal, crescimento intra-uterino restrito e prematuridade, bem como associada a complicações graves como descolamento prematuro de placenta, coagulação intravascular disseminada, hemorragia cerebral, insuficiência hepática e renal (FRIEDMAN *et al*, 1995).

2.1 Epidemiologia

No Brasil a incidência de Doença Hipertensiva Gestacional é de 7,5%, sendo 4% de hipertensão crônica e 2,3% de pré-eclâmpsia (PE) (GAIO *et al*, 2002).

O ambulatório de Obstetrícia do Hospital São Lucas (HSL) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) apresentou uma incidência de 4,6% de PE em pacientes previamente hípidas em 1998 (GALÃO, 2000).

A Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul revelou um coeficiente de morte materna por complicações da gestação, do parto e do puerpério de 47,2 por 100.000 nascidos vivos em 2000, tendo como causas mais freqüentes hipertensão arterial (HA) (8%), infecção puerperal (5,8%) e aborto (5,4%) (SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, 2007).

2.2 Fatores de risco

Diversos fatores de risco parecem estar relacionados com a incidência de pré-eclâmpsia.

Os fatores de risco pré-concepcionais incluem: história prévia de pré-eclâmpsia; extremos de idade reprodutiva – adolescentes com menos de 16 anos e mulheres com mais de 35 anos, principalmente primigestas com mais de 40 anos; história familiar; associações mórbidas; paridade; gemelaridade e raça negra (CARITIS *et al*, 1998; LIE *et al*, 1998; ODEGARD *et al*, 2000).

Dentre as associações mórbidas destacam-se: hipertensão crônica pré-gestacional (25-50% desenvolvem pré-eclâmpsia sobreposta), diabetes (24-56%) ou resistência a insulina, obesidade, doença renal vascular ou parenquimatosa, hiperhomocisteinemia, estresse e doenças auto-imunes como lúpus e síndrome antifosfolípídica (NEME, 1998; ROBERTS, 1999; GIFFORD *et al*, 2000).

Quanto a hereditariedade, filhas de pais com história familiar positiva para PE parecem ter predisposição para desenvolver a doença (SUTHERLAND *et al*, 1981; PIPKIN, 2001; ESPLIN *et al*, 2001), bem como pacientes com presença de PE

em gestação anterior (CHAMBERS *et al*, 2001). No nosso meio verificou-se ocorrência significativamente maior de PE em pacientes com história familiar de hipertensão e em filhas de mães que tiveram PE (ANTONELLO *et al*, 1990).

A nuliparidade ou primigestação tem se mostrado, em diversos estudos, fator relevante, sendo 6 a 8 vezes mais suscetíveis do que multigestas (CHESLEY, 1985; CAMPBELL, 1985). São gestantes que apresentam ganho de peso rápido, edema generalizado e sintomas como mal-estar, cefaléia, dor epigástrica e no quadrante superior direito do abdômen, náuseas, distúrbios visuais e hiper-reflexia (SIBAI *et al*, 1997).

Quanto aos fatores de risco associados a gestação cabe salientar: gestação múltipla (4 a 5 vezes maior); infecção urinária; anomalias congênitas e cromossômicas; mola hidatiforme; inserção placentária; polidramnia e aloimunização feto-materna (CARITIS *et al*, 1998; LIE *et al*, 1998).

2.3 Classificação

Inúmeras definições vêm sendo atribuídas à síndrome de pré-eclâmpsia (SPE) ao longo dos anos e, em decorrência disso, diversas classificações surgiram neste período envolvendo aspectos clínicos, correlação clínico-patológica e complicações associadas ao quadro.

A revisão da literatura descreve estudos de grupos que utilizam diversas características para diagnosticar a doença, como: paridade, proteinúria abundante, história prévia confiável de patologia renal ou cardiovascular, idade, biópsia renal e diagnóstico retrospectivo por acompanhamento pós-parto das pacientes (CHESLEY, 1985; NOBUNAGA *et al*, 1996; DAVIDGE *et al*, 1996; SMÁRASON *et al*, 1997). O diagnóstico inicial sustentado por biópsia renal é considerado eticamente incorreto, por tratar-se de um procedimento de risco sem benefício à evolução ou ao tratamento da paciente (KULLER *et al*, 2001).

Mais recentemente, devido a esta patologia se caracterizar como uma síndrome, é classificada como uma DHG pelo último relatório do grupo americano de estudos em pressão alta na gestação: *National High Blood Pressure Education Program Working Group* (NHBPEPWG) (GIFFORD *et al*, 2000), apesar de ainda não ser um consenso entre os vários grupos de referência (DAVEY & MACGILLIVRAY, 1986; AKINKUGBE *et al*, 1987; AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS, 1996; HELEWA *et al*, 1997; BROWN *et al*, 2000).

De acordo com relatório do *National High Blood Pressure Education Program Working Group* os conceitos da Doença Hipertensiva Gestacional são (GIFFORD *et al*, 2000):

pré-eclâmpsia/eclâmpsia: síndrome específica da gravidez humana, que ocorre após a vigésima semana de gestação e é caracterizada por hipertensão arterial e proteinúria patológica. A hipertensão é definida como pressão arterial sistólica (PAS) acima de 139mmHg, e diastólica (PAD) acima de 89mmHg em gestante previamente normotensa. A proteinúria é definida como patológica quando ultrapassar 300mg em 24 horas. A doença também é suspeita quando gestantes hipertensas apresentarem cefaléia, borramento visual, dor no epigástrico e hipocôndrio direito mesmo na ausência de proteinúria. A proteinúria e a pressão arterial devem voltar ao normal em 12 semanas após o parto. A evolução para eclâmpsia (E) caracteriza-se por convulsões nestas pacientes;

hipertensão crônica (HC): presença de hipertensão arterial prévia à gestação, que continua após o término da gravidez, ou que aparece antes da vigésima semana gestacional. A hipertensão diagnosticada pela primeira vez durante a gestação, e que não resolve após o parto, é também classificada como hipertensão crônica;

pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica (PES): é o desenvolvimento da SPE em paciente com hipertensão crônica. O exame de fundo de olho, como expediente de diferenciação, pode apresentar lesão vascular se a paciente for hipertensa crônica. O diagnóstico de pré-eclâmpsia sobreposta é provável nas seguintes situações: a) em mulheres hipertensas e sem proteinúria no início da gestação (menos de 20 semanas) que desenvolvem proteinúria durante a gestação; b) em mulheres com hipertensão e proteinúria prévias à vigésima semana gestacional e que desenvolvem aumento súbito de proteinúria, pressão arterial, transaminases, bem como trombocitopenia (plaquetas abaixo de $100.000/\text{mm}^3$);

hipertensão gestacional (HG): gestante com hipertensão detectada pela primeira vez após a vigésima semana de gestação sem proteinúria patológica. O diagnóstico só pode ser confirmado com a normalização da pressão arterial e da excreção urinária de proteínas no período de 12 semanas após o parto, e então será classificado como hipertensão transitória. Se a pressão arterial elevada persistir após as doze semanas, a paciente será considerada como hipertensa crônica.

2.4 Caracterização

A pré-eclâmpsia é uma síndrome com manifestações maternas e fetais podendo causar descolamento prematuro de placenta, coagulação intravascular disseminada, hemólise, hemorragia cerebral, falência hepática, edema agudo de pulmão e insuficiência renal aguda na gestante. No feto pode ocorrer crescimento intra-uterino restrito, hipóxia fetal e prematuridade (FRIEDMAN *et al*, 1995).

A hipertensão arterial, característica clínica mais importante da DHG, está relacionada com espasmo arteriolar generalizado e marcado aumento da resistência vascular periférica. Os vasos tornam-se hiper-responsivos a substâncias como a angiotensina II, norepinefrina e endotelinas, que pode ser consequência de uma redução na atividade da óxido nítrico sintase (NOS) e diminuição da

produção de óxido nítrico (NO) (SELLIMAN *et al*, 1994; BEGUM *et al*, 1996; BAYLIS *et al*, 1998). A atividade plasmática da renina está reduzida nas pacientes hipertensas, os níveis de aldosterona parecem ser idênticos aos das gestantes normais e os receptores mineralocorticóides podem estar aumentados, bem como a concentração do hormônio natriurético atrial (BARRON, 1993; CASTRO *et al*, 1994; AUGUST & SEALEY, 1995; ROBERTS, 1998). Há elevação dos níveis de tromboxano e queda nas concentrações de prostraciclina (DEKKER & SIBAI, 1998).

O sistema de coagulação é ativado, consumindo plaquetas e formando microtrombos, dificultando circulação sangüínea e gerando edema e perda de proteínas circulantes (DEKKER & SIBAI, 1998; ROWLAND *et al*, 2000).

Também há redução da volemia que parece ocorrer antes mesmo do surgimento da síndrome hipertensiva, ao contrário do que acontece nas gestantes normais onde há expansão do volume plasmático e da relação deste fenômeno com o peso fetal (GALLERY & BROWN, 1987).

Durante a PE ocorre aumento do débito cardíaco, da resistência vascular e da pressão capilar pulmonar, acompanhados de função ventricular normal ou hiperdinâmica (VISSER & WALTENBURG, 1991; GIFFORD *et al*, 2000).

O funcionamento renal, na DHG, caracteriza-se por redução do fluxo plasmático renal, com conseqüente queda da filtração glomerular levando a diminuição da produção de urina e elevação dos níveis de uréia e creatinina no plasma. A função tubular é prejudicada levando a maior reabsorção de água, sódio e ácido úrico. Após ocorre o dano glomerular levando a proteinúria (AUGUST & LINDHEIMER, 1995; ROBERTS, 1998; HAUT & CUNNINGHAM, 1998).

Há descrição de alterações hepáticas na DHG por obstrução ao fluxo sangüíneo e isquemia, levando a edema local, dor, elevação das transaminases e

necrose hemorrágica periportal. Estas alterações também afetam a produção dos fatores de coagulação levando ao aumento da viscosidade sangüínea; trombocitopenia relacionada à deposição plaquetária em lesões endoteliais; redução dos níveis de antitrombina III (NEME, 1998; HAUT & CUNNINGHAM, 1998). A associação de enzimas hepáticas elevadas, hemólise e plaquetopenia caracteriza a síndrome HELLP (**H**emolysis, **E**levated **L**iver **E**nzymes, **L**ow **P**latelet) que é uma forma grave de pré-eclâmpsia com altos índices de morbi-mortalidade.

Alterações cerebrais como crises convulsivas, distúrbios visuais e encefalopatia hipertensiva são causados por edema cerebral e isquemia cerebral focal (NEME, 1998; HAUT & CUNNINGHAM, 1998).

No Laboratório de Análises Clínicas estas alterações manifestam-se como: aumento dos níveis de hematócrito (Hct) e hemoglobina (Hb) devido a hemoconcentração; plaquetopenia (abaixo de 100.000 plaquetas/mm³ determinam gravidade); alteração nos níveis de fibrinogênio, produtos de degradação da fibrina e de tempo de protrombina; hiperuricemia – considerado um marcador da doença.

Níveis de proteinúria acima de 300mg/dL em amostra de 24 horas caracteriza a SPE e pode ser determinada por coleta de urina de 24 horas, medida da relação entre proteinúria e creatininúria em amostra de urina, ou ainda, correlaciona-se com leitura qualitativa igual ou maior de 1+ na fita reagente. O padrão ideal é a medida na urina de 24 horas mas, devido a grande dificuldade de realizar esta coleta adequadamente, neste estudo optamos por utilizar a estimativa através da relação entre proteinúria e creatininúria em amostra de urina ou determinar a creatininúria na urina de 24 horas para excluir possíveis erros (GIFFORD *et al*, 2000).

O exame diagnóstico padrão-ouro na DHG é a biópsia renal, no entanto, devido ao grau de morbidade deste procedimento só deve ser realizado em

condições especiais e distante do termo da gestação (FRIEDMAN & LINDHEIMER, 1998; KULLER *et al*, 2001).

2.5 Etiopatogenia

A importância dos estudos envolvendo pré-eclâmpsia e hipertensão crônica e gestacional está no fato de ser uma síndrome sistêmica de natureza isquêmica que afeta placenta, rins, fígado e cérebro (GIFFORD *et al*, 2000; ODEGARD *et al*, 2000), levando a morbidade e mortalidade materna e fetal.

A causa da PE ainda é desconhecida e diversas teorias têm sido descritas sendo portanto conhecida como a “moléstia das teorias” (NEME, 1998). No entanto sabe-se que sua cura depende da retirada da placenta; fato que reforça o envolvimento das alterações hemodinâmicas maternas implicadas no suprimento placentário, na etiopatogenia desta síndrome de natureza multissistêmica (CHESLEY, 1980; NEME, 1998).

Assim, isquemia placentária, toxicidade das lipoproteínas de muito baixa densidade, adaptação imune, disfunção endotelial e herança genética parecem estar envolvidos como marcadores desta doença (DEKKER & SIBAI, 1998).

A importância do endotélio como regulador da resistência vascular periférica e do equilíbrio entre substâncias vasoativas como as prostaglandinas (CONRAD & COLPOYS, 1986), óxido nítrico e fator hiperpolarizante do endotélio (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980) – relaxantes – e endotelina, tromboxano, angiotensina II e radicais livres – constritoras - no mecanismo fisiopatológico desta síndrome não está bem esclarecido, mas vêm sendo amplamente divulgado em diversos estudos (SELLIGMAN *et al*, 1994; MCLAUGHLIN & CONRAD, 1995; MORRIS *et al*, 1996; ROSSELI *et al*, 1998; ROBERTS, 1999).

A teoria da isquemia uteroplacentária tem sido descrita como fator importante na etiopatogenia desta doença. A placentação é defeituosa na PE, pois o trofoblasto penetra somente nos segmentos deciduais mais superficiais das artérias espiraladas deixando estreitos e musculares os segmentos mais profundos gerando hipóxia placentária, estresse oxidativo, aumento da pressão arterial e infarto placentário. Também ocorre bloqueio de alguns vasos por formação de plaquetas e trombose associada (ROBERTSON *et al*, 1975). Esta lesão vascular é conhecida como aterosose aguda e necrose fibrinóide, que ocorre na camada média dos vasos. Na íntima surge fibrina, macrófagos com lipídios e células musculares lisas (BARRON, 1993; DOMINICZAK & BOHR, 1995; ROBERTS, 1998; DEKKER & SIBAI, 2001). Esta redução no fluxo uteroplacentário e isquemia trofoblástica está relacionada com menor produção de prostaglandina e maior de tromboxano, tendo este desequilíbrio um efeito vasoconstritor e agregador placentário presentes na PE (LIEBERMANN, 1998; NEME, 1998).

A endoteliose glomerular tem sido considerada a lesão patognomônica da PE e evidencia a disfunção endotelial que ocorre nesta síndrome. Caracteriza-se por aumento do volume da célula endotelial, vacuolização do citoplasma e presença de depósitos fibrinóides sub-endoteliais (KINCAID-SMITH & FAIRLEY, 1993), bem como presença de produtos celulares do endotélio no soro como endotelina-1, fibronectina celular, fator ativador do plasminogênio e inibidor-1 deste fator e outros (POSTON, 1996). Isso implica em redução da perfusão e elevação da pressão arterial *per se*, anteriormente à ruptura vascular mecânica. Assim pode-se dizer que o dano no endotélio materno pode ocorrer por fatores circulantes liberados pela hipoxemia placentária ou por meio de estresse oxidativo (HAYMAN *et al*, 1999; ROBERTS & COOPER, 2001). Recentemente foi publicado um polêmico trabalho que relatou endoteliose glomerular em gestantes normais (STREVENS *et al*, 2003).

Esta má formação placentária também está associada com a excessiva resposta inflamatória da mãe à gestação caracterizada por ativação de elementos como monócitos, granulócitos, fator de necrose tumoral- α e seus receptores, fosfolipase A_2 e sistemas de complemento e coagulação, o que pode contribuir com a disfunção endotelial (REDMAN *et al*, 1999; REDMAN & SARGENT, 2000).

A placenta com hipoxemia produz radicais livres e espécies reativas de oxigênio que também podem causar dano endotelial quando associadas com lipídios plasmáticos que estão alterados na PE. Ocorre redução nos níveis de lipoproteínas de baixa densidade e triglicerídeos que podem sofrer oxidação e alterar proteínas e fosfolipídios da membrana celular afetando a função endotelial (DEKKER & SIBAI, 1998; ROBERTS & COOPER, 2001; GRANGER *et al*, 2001).

A isquemia placentária pode estar relacionada a alterações em fatores angiogênicos. Estudos recentes mostraram que a hipertensão e a proteinúria na PE podem ser secundárias a um excesso de fatores anti-angiogênicos circulantes, como o tirosina quinase 1 fms-*simile* solúvel (sFlt1) e a endoglina solúvel. O sFlt1 é uma proteína endógena produzida pela placenta que se liga aos fatores angiogênicos circulantes, fator de crescimento endotelial (VEGF) e fator de crescimento placentário (PlGF), inibindo suas funções. A endoglina é uma proteína coreceptora do TGFbeta1 e TGFbeta3, que é produzida em excesso na placenta de pré-eclâmpticas, sendo sua fração solúvel liberada na circulação inibindo o TGFbeta1 na vasculatura. A elevação da endoglina solúvel inclusive atua de forma sinérgica com o sFlt1 e está relacionada a severidade da doença e a síndrome HELLP (LEVINE *et al*, 2004; LEVINE *et al* 2006; LUFT, 2006).

Ainda existem evidências de que a resposta imune materna ao trofoblasto invasor esteja envolvida na formação da placenta, que pode ser desencadeada pela carga genética paterna expressada na atividade gênica fetal, mesmo que em pequenas proporções (CARITIS *et al*, 1998; DIETL, 2000; WALKER, 2000).

3. Via L-arginina – NO

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas envolvendo a importância do endotélio e de substâncias vasoativas na regulação da resistência vascular periférica e controle da pressão arterial, entre elas o óxido nítrico.

Estudos realizados em 1980 demonstraram que o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina é dependente da presença de endotélio e mediado por um fator humoral e lábil chamado de fator relaxante derivado do endotélio (FRDE) (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; GRIFFITH *et al*, 1984). Posteriormente verificou-se que o FRDE era uma substância com meia-vida de segundos quando em soluções salinas fisiológicas oxigenadas, e sinalizadora da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), presente nas células da musculatura lisa dos vasos, que ativa a guanosina monofosfato cíclica (GMPc) intracelular (GRIFFITH *et al*, 1984; MONCADA *et al*, 1991; MONCADA & HIGGS, 1993). Estudos posteriores verificaram que o FRDE e NO eram a mesma molécula, devido a comparação detalhada do comportamento em fibras vasculares e plaquetas onde mostraram-se indistinguíveis na atividade biológica, estabilidade e suscetibilidade a inibidores e potencializadores. Ambos causaram relaxamento das fibras vasculares, inibiram a agregação e a adesão plaquetária, foram igualmente potencializados pela enzima superóxido dismutase e citocromo c e inibidos pela presença de hemoglobina, ferro e hiperoxia (PALMER *et al*, 1988; MONCADA *et al*, 1991).

O óxido nítrico é um gás incolor, solúvel e muito instável eletroquimicamente. Na ausência de oxigênio, dissolve-se em água e, sob estas condições, é estável. Em solução aquosa, ultrafiltrado e plasma, forma nitrito (NO_2^-), no sangue, o nitrito é rapidamente convertido em nitrato (NO_3^-) (PALMER *et al*, 1988; MONCADA *et al*, 1991; MONCADA & HIGGS, 1993).

A produção basal de NO possui um papel importante na regulação da pressão arterial e do fluxo sanguíneo pois contribui para a resposta de vasodilatadores dependentes do endotélio *in vivo* (MONCADA *et al*, 1988; MONCADA, 1997). Há sugestão de que o sistema cardiovascular seja um estado de constante vasodilatação ativa dependente da produção de NO, considerado um nitrovasodilatador endógeno inteiramente regulado localmente e, provavelmente, um dos mais simples e fundamentais mecanismos adaptativos deste sistema (MONCADA *et al*, 1991).

O óxido nítrico tem um importante papel na regulação da contratilidade miocárdica, agregação plaquetária, tônus vascular e imunomodulação. Portanto, depleção de NO ou redução da sua eficiência no sistema efetor, podem estar envolvidas na patogênese da hipertensão, angina, vasoespasmo e aterosclerose. Por outro lado, o aumento inapropriado da produção de NO pode estar implicado em hipotensão, sepse, choque, depressão miocárdica e respostas inflamatórias (FELDMAN *et al*, 1993; MARÍN & RODRÍGUES-MARTÍNEZ, 1997).

Óxido nítrico também reduz a adesão de leucócitos às células endoteliais e inibe a agregação e adesão plaquetária, por dependência de GMPc e sinergismo com prostaglandinas, possuindo um efeito útil como terapia anti-trombótica (MONCADA *et al*, 1991; MONCADA & HIGGS, 1993; HAWIGER, 1995).

Em revisão sobre fisiopatologia e farmacologia do NO, publicada por Moncada em 1991, estão descritas detalhadamente as ações desta molécula no sistema nervoso central e periférico. No sistema nervoso central, o NO é um neurotransmissor com diversas funções. A reação neste sistema é catalisada pela óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) aumentando a síntese de GMPc, caracterizando a sua participação em processos como o da memória. No sistema nervoso periférico media algumas formas de vasodilatação neurogênica e

regulação de várias funções gastrointestinais, respiratórias e genitourinárias (MONCADA *et al*, 1991; IGNARRO, 1996).

O NO também é sintetizado, na dependência de cálcio e sob ação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), após estimulação imunológica, nos macrófagos e neutrófilos, e age como mecanismo de defesa, através de efeito citotóxico ou citostático para células tumorais ou organismos invasores (MONCADA *et al*, 1991).

O NO é sintetizado a partir do aminoácido semi-essencial L-arginina obtido através da dieta alimentar (cerca de 2%) e por síntese hepática e renal. A L-arginina é filtrada pelo rim e reabsorvida ao longo do túbulo proximal e porções distais do néfron. Em seres humanos 30% a 44% da L-arginina ingerida é absorvida e transferida à circulação esplênica, o restante (56% a 70%) é metabolizado pelos enterócitos ou excretado pelo tubo intestinal. A absorção intestinal da L-arginina ocorre no jejuno. A homeostase da L-arginina é determinada pelo balanço entre ingesta dietética e síntese. Quando a degradação e/ou utilização aumenta, como na fase de crescimento, trauma e sepse, torna-se um aminoácido essencial e a ingesta dietética deve ser aumentada. Sob condições fisiológicas, os níveis plasmáticos e sua utilização dependem da síntese no rim, por um mecanismo que parece ser independente da ingesta dietética. O metabolismo da L-arginina pode ser determinado pelos níveis plasmáticos de L-arginina, L-citrulina, amônia, uréia e creatinina, e por determinação da excreção urinária de GMPc, nitrato e nitritos, ácido orótico, uréia e creatinina (REYES *et al*, 1994).

A L-arginina participa simultaneamente de diversas vias metabólicas no organismo: sua conversão em L-ornitina e uréia é uma via que serve para eliminar do organismo compostos nitrogenados não-essenciais; a síntese de creatina e creatinina; a síntese de pirimidinas, necessárias para o crescimento celular e

tecidual, por modulação na produção de ácido orótico; a produção de hormônios, especialmente catecolaminas, corticosterona, glucagon, hormônio do crescimento, insulina, prolactina e somatostatina (REYES *et al*, 1994).

A via metabólica da síntese do NO pelas células utiliza este aminoácido como precursor exclusivo. As células endoteliais e macrófagos, cultivados na ausência de L-arginina, mostraram uma redução na produção do FRDE, que foi restaurada após a infusão de L-arginina, e não de D-arginina, sugerindo que a formação do NO é dependente somente de L-arginina livre (PALMER *et al*, 1988; MONCADA *et al*, 1991). Estudos de espectrometria de massa, usando L-arginina marcada com N¹⁵, indicam que a formação de NO advém de um átomo de nitrogênio do grupo guanidino terminal da L-arginina (PALMER *et al*, 1988; HIBBS *et al*, 1990). Posteriormente, foram descritos outros fatores para a síntese do NO, como o cálcio, calmodulina e tetrahydrobiopterina (FELDMAN *et al*, 1993).

A reação de formação do NO nessas células resulta da ligação de íons Ca²⁺ - uma sinalização celular promovida por hormônios, autacóides, bradicinina, acetilcolina, adenosina difosfato, adenosina trifosfato (ATP) e histamina - com calmodulina (proteína intracelular de baixo peso molecular). Este complexo ativa a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) que catalisa, na presença de oxigênio, a transformação de L-arginina em L-citrulina e óxido nítrico, concomitante com a oxidação da nicotinamida-adenina dinucleotídeo-fosfato (NADPH) (MONCADA & HIGGS, 1993). A posição da eNOS próxima à membrana plasmática beneficia as células adjacentes (POLLOCK *et al*, 1991), permitindo a rápida difusão do NO (LANCASTER, 1996); este processo otimiza o papel do monóxido de nitrogênio, que tem, no meio fisiológico, meia-vida muito curta: 6-8 segundos (FURCHGOTT & VANHOUTTE, 1989).

Dentro da célula muscular lisa dos vasos, o NO liga-se muito rapidamente ($10^7\text{M}^{-1}\cdot\text{seg}^{-1}$) ao átomo de ferro presente no sítio ativo da enzima guanilato ciclase

solúvel, a qual catalisa a hidrólise do nucleotídeo guanosina trifosfato (GTP) produzindo GMPc, o agente promotor do relaxamento vascular. O relaxamento é proporcional à concentração de GMPc, porque contrapondo-se ao aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular, este nucleotídeo retira Ca^{2+} do retículo endoplasmático e ativa a proteína quinase G, a qual fosforila a quinase da miosina de cadeia leve, inativando-a. O aumento da concentração do cálcio intracelular leva à contração do músculo liso. Depois, o GMPc se liga e ativa uma fosfodiesterase de nucleotídeos cíclicos – enzima constituinte do plasma - que hidroliza 3'-5'GMPc, transformando-o em guanosina monofosfato (GMP). Inativado, sua fosforilação formará GTP - ponto de partida do ciclo (MURAD, 1999). A Figura 1 demonstra essas etapas da via L-arginina-óxido nítrico.

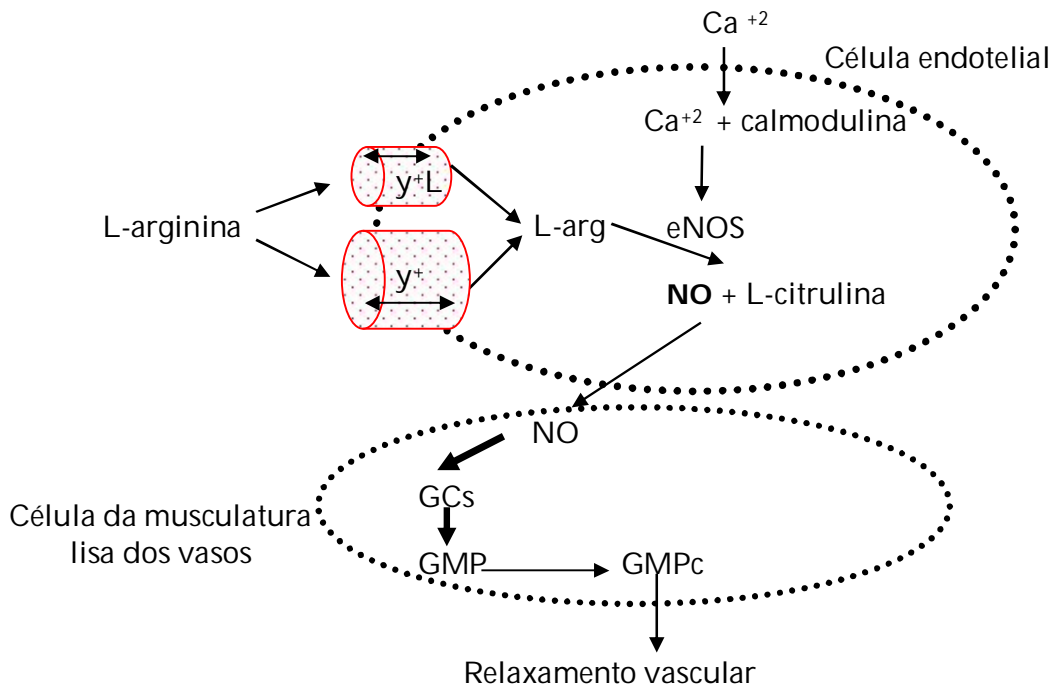


Figura 1. Via de formação do óxido nítrico derivado do endotélio.

Os metabólitos NO_2 e NO_3 resultam da oxidação do óxido nítrico pela reação com a água do plasma sanguíneo e podem ser detectados na urina, constituindo um indicativo de sua produção renal (BAYLIS & VALLANCE, 1998).

A concentração de NO dosada por Malinski e Taha *in vivo* é de 10-400nM (MALINSKI & TAHA, 1992). Diferentes estímulos fisiológicos podem participar da produção de NO, como tensão de cisalhamento, alterações na concentração de cálcio ou de oxigênio. A tensão de cisalhamento, produzida na superfície luminal do endotélio vascular em resposta ao aumento da pressão arterial, sugere que este é o estímulo fisiológico mais importante para a produção de NO endotelial (MONCADA *et al*, 1991; MARÍN & RODRÍGUES-MARTÍNEZ, 1997).

A óxido nítrico sintase é uma proteína homodimérica de aproximadamente 130-150kDa que contém os quatro grupos prostéticos: flavina-adenina dinucleotídeo, flavina mononucleotídeo, tetrahydrobiopterina e ferro-protoporfirina IX. Na extremidade amino-terminal, que contém um sítio de fosforilação e é composta por tetrahydrobiopterina e Fe^{3+} -heme, se liga à L-arginina (KLATT *et al*, 1996).

Existem três tipos de enzima NOS. As isoformas endotelial (eNOS ou tipo III) e neuronal (nNOS ou tipo I) são constitutivas, citosólicas, dependente de cálcio e calmodulina e produzem NO por curtos períodos, em resposta a um receptor ou estimulação física. A isoforma induzível (iNOS ou tipo II) é produzida por ativação de macrófagos, células endoteliais, endotoxinas e citocinas, é citosólica, independente de cálcio, e, somente quando expressada, sintetiza NO por longos períodos. Tanto a NOS endotelial e neuronal quanto a induzível possuem sítios de reconhecimento do NADPH e contém tetrahydrobiopterina, que conjuntamente com oxigênio, são essenciais para a atividade destas enzimas (FELDMAN *et al*, 1993). A NOS endotelial é encontrada no endotélio vascular, plaquetas, endocárdio e miocárdio.

A NOS é inibida por análogos da L-arginina como: N^G-mono metil-L-arginina (L-NMMA), N^G-metil-L-arginina (L-NMA) e N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (GRIFFITH & KILBOURN, 1996).

4. Transporte através da membrana celular

A membrana plasmática é a estrutura que circunda a célula, definindo seus limites e formando uma interface entre os meios intra e extracelular. É uma estrutura dinâmica que permite dirigir o movimento transmembrana de íons e moléculas selecionadas, e assimétrica, refletindo as suas diferentes funções como sintetizar ATP, produzir e transmitir sinais elétricos, atuar como sensores de sinais ambientais, participar da comunicação intercelular, adesão, resposta imune, controle do meio iônico interno e potencial de membrana, e prover suprimento de moléculas básicas como açúcares, aminoácidos, nucleotídeos, lipídios e outros (ALBERTS *et al*, 1997).

A membrana plasmática é constituída por uma dupla camada lipídica mosaico-fluída que serve de matriz para proteínas embebidas, que funcionam como canais iônicos, sistemas de acoplamento receptor-efetor, transportadores etc. Possui uma espessura de aproximadamente 80Å, sendo menos de 50Å a dupla camada lipídica. O restante é composto da porção de glicoproteínas e glicolipídios, que se estende a partir da face externa, e do citoesqueleto, no lado interno da membrana.

Os lipídios da membrana plasmática formam a estrutura principal devido a seus efeitos hidrofóbicos e características anfipáticas, que os faz formar bicamadas espontaneamente em solução aquosa. Estes lipídios são especialmente ricos em colesterol, o que torna mais organizados os fosfolipídios e condensa a área de

superfície, deixando a estrutura mais rígida e minimizando a permeabilidade da dupla camada lipídica. Assim sendo, esta tem a função primária de limitar a difusão de substâncias através da membrana celular (EVANS & GRAHAM, 1989).

A inserção de proteínas especializadas na dupla camada de lipídios, denominadas proteínas transportadoras, proporciona à célula outro modo de seleção das trocas entre os ambientes extra e intracelular, permitindo a passagem de moléculas polares como íons, açúcares, aminoácidos e nucleotídeos (EVANS & GRAHAM, 1989).

Diversos estudos realizados com sistemas de transporte permitiram a determinação de algumas características básicas destas proteínas: são proteínas inseridas na membrana; mostram especificidade por seus substratos independente de seus tamanhos, ao contrário dos canais que têm especificidade limitada ao tamanho do substrato; podem ser inibidas por bloqueadores específicos - proteínas reagentes (quando a inibição é usualmente não-competitiva) ou análogos de substratos (quando a inibição é competitiva); mostram saturação, ou seja, correspondem aos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten; existem em diferentes conformações, permitindo ao substrato ter acesso aos sítios ligantes do carreador de um lado e outro da membrana (STEIN, 1990).

O transporte de aminoácidos através da membrana celular dá-se, predominantemente, por difusão facilitada, ou seja, através de transportador saturável, com fluxo dependente da concentração do ligante nos meios intra e extracelular (STEIN, 1990). Neste transporte a proteína pode apresentar-se em conformações químicas diferentes, ou seja, é hábil para ligar um substrato e transferí-lo para um lado da membrana, ao mesmo tempo em que faz o mesmo para o outro lado. Isto só é possível devido a capacidade de alterar sua conformação (YOUNG & ELLORY, 1982).

O transporte de aminoácidos permite a sobrevivência da célula pois são essenciais para a síntese protéica e metabolismo celular. Podem ser encontrados tanto na forma livre quanto ligados a peptídeos e proteínas. Os 20 aminoácidos primários são: alanina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutâmico, glutamina, histidina, serina, prolina, tirosina, arginina, cisteína, glicina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, metionina, triptofano, valina e treonina. Os últimos oito componentes chamados de aminoácidos essenciais são sintetizados por mamíferos (YUDILEVICH & BOYD, 1987).

Os sistemas de transporte de aminoácidos são inicialmente identificados pela sua afinidade com o substrato, pela freqüente dependência da presença de sódio (Na⁺) no meio extracelular e sua classificação varia conforme a especificidade pelo ligante (ELLORY, 1987).

O sistema "gly" tem especificidade de substrato muito limitada, transportando somente glicina e sarcosina, e requer a presença do íon sódio no meio extracelular. Os sistemas "ASC", "asc" e "C" têm grande semelhança quanto a especificidade ao substrato, porém diferem significativamente quanto à afinidade e dependência de cátion. Em células humanas, o sistema "ASC" sódio-dependente é a principal rota para manutenção dos níveis plasmáticos de cisteína, e apresenta uma significativa afinidade por alanina, serina e treonina. O sistema "C" tem uma significativa, mas pequena, afinidade por ornitina e lisina, mas não por arginina (AL-SALEH & WHEELER, 1982; ELLORY, 1987).

O sistema "L" transporta valina, leucina e fenilalanina. É o sistema com maior capacidade de transporte, provavelmente devido a relativa abundância na membrana celular, e tem ampla distribuição tecidual e entre espécies. O sistema "T" apresenta afinidade somente por aminoácidos aromáticos, como triptofano, tirosina e fenilalanina. O sistema "N" foi inicialmente identificado em hepatócitos

e após em eritrócitos humanos, com relativa afinidade para glutamina, asparagina e histidina, sendo também sódio-dependente (ELLORY, 1987).

Os sistemas de transporte para aminoácidos catiônicos são: o sistema y^+ seletivo para lisina, arginina e ornitina na ausência de sódio (CHRISTENSEN & ANTONIOLI, 1969); o y^+L aceita uma grande variedade de substratos – lisina, arginina, leucina, metionina, glicina – mas difere na interação com íons orgânicos monovalentes (DEVÉS *et al*, 1992); o sistema $b^{0,+}$ transporta lisina, arginina e leucina e é sódio independente, funcionando na presença também de potássio, colina e lítio; e o $B^{0,+}$ que transporta lisina, arginina, alanina, valina é dependente de sódio (DEVÉS & BOYD, 1998).

5. Transporte de L-arginina através da membrana celular

A L-arginina é transportada através da membrana celular por difusão facilitada, necessitando da existência de uma proteína transportadora e de um gradiente de substrato. Dos quatro sistemas envolvidos no fluxo exógeno da L-arginina na membrana celular, dois deles estão bem estabelecidos: o y^+L , de alta afinidade e baixa capacidade, e o y^+ , de baixa afinidade e alta capacidade de transporte (DEVÉS *et al*, 1992).

As proteínas y^+L e y^+ são identificadas como proteína transportadora de cátions (CAT) e as proteínas de transporte amplo de aminoácidos (BAT) (DEVÉS & BOYD, 1998).

5.1 Sistema y^+

Em eritrócitos e placenta, o sistema y^+ pode ser distinguido, com base na afinidade por aminoácidos catiônicos, do transportador de alta afinidade, chamado y^+L . A inibição do influxo de lisina por concentrações crescentes de arginina em eritrócitos humanos é consistente com o modelo de dois sistemas de transporte com diferentes afinidades, como observado em alguns estudos (FORRAY *et al*, 1995).

O sistema y^+ parece ser uma das rotas primárias do transporte da L-arginina na célula endotelial da artéria pulmonar porcina. Este estudo avaliou a capacidade de análogos desse aminoácido inibir competitivamente o seu transporte pelo sistema y^+ , já que estes similares, produzidos laboratorialmente, parecem acarretar algum efeito clínico como inibidores da NOS. O transporte através do sistema y^+ , nestas células, funcionou de modo bi-direcional, permitindo equilíbrio do substrato através da membrana plasmática. Dados mostraram que alterações estruturais nos canais de entrada da L-arginina, podem estar envolvidas no mecanismo pelo qual os inibidores da NOS são tomados como substratos e inibidores do transportador. Observou-se que estes inibidores têm potencial para reduzir produção de NO pelos mecanismos: indiretamente, por bloqueio do influxo de L-arginina através da membrana plasmática; por depleção da L-arginina intracelular através de transestimulação e, diretamente, agindo na enzima NOS (MCDONALD *et al*, 1997).

Uma das limitações para o estudo do transporte de aminoácidos é a carência de seletividade dos inibidores para diferentes transportadores. Devés registrou o estudo isolado dos dois sistemas de transporte da L-arginina utilizando o *N*-etilmaleimida (NEM) em eritrócitos humanos (DEVÉS *et al*, 1993). Este reagente inativa seletivamente o sistema y^+ , mantendo o y^+L intacto, o que permite examinar a especificidade e a dependência de cátion do sistema y^+L .

5.2 Sistema y^+L

O sistema y^+L é um transportador de amplo espectro, ligando tanto aminoácidos neutros quanto catiônicos. Tem sido descrito em eritrócitos, endotélio, placenta, linfócitos e oócitos humanos. Foi identificado através da inibição do influxo de L-lisina por aminoácidos neutros - L-leucina, L-alanina, L-cisteína, L-serina, L-isoleucina, L-fenilalanina, L-metionina - em eritrócitos humanos. Todos esses aminoácidos são capazes de inibir o influxo de L-lisina, porém o padrão de inibição foi bifásico, sendo que um deles reconheceu tanto aminoácidos neutros quanto catiônicos com alta afinidade. Foi observado também que, quando o sódio no meio extracelular era substituído por potássio, ocorria redução da afinidade de um dos transportadores por aminoácidos neutros. A partir destas observações, o sistema y^+L foi identificado como de alta afinidade e baixa capacidade, capaz de ligar-se tanto a aminoácidos neutros quanto catiônicos (DEVÉS *et al*, 1992).

Utilizando o reagente NEM, inativando o sistema y^+ , verificou-se que esse sistema parece ser o único que reconhece tanto aminoácidos catiônicos quanto neutros com alta afinidade, mostrando efeitos diferentes na interação de cátions monovalentes com aminoácidos neutros. As ligações do sistema y^+L com aminoácidos catiônicos ocorrem em meio com sódio e/ou potássio, no entanto, a associação com aminoácidos neutros é estritamente dependente de Na^+ . Esta especificidade é atribuída aos aminoácidos catiônicos, por alterarem a conformação do carreador, e não por interação direta com o sistema (DEVÉS *et al*, 1993).

O sistema y^+L pode ser responsável pelo acúmulo de lisina em eritrócitos humanos. Estudo mostrou que o transporte de L-lisina aumentou os níveis intracelulares de células tratadas com NEM. Embora o influxo inicial estivesse aumentado quando os dois sistemas estavam funcionando, a magnitude de

acumulação foi maior quando somente o y^+L estava ativo. Isso ocorre porque, sob condições experimentais, o sistema y^+L funcionaria como uma rota de saída da lisina. A maior acumulação observada somente na presença do y^+L pode ser devida ao contratransporte de aminoácidos endógenos. O contratransporte não ocorre com o sistema y^+ , porque sua especificidade é restrita a aminoácidos catiônicos, que estão presentes em pequenas concentrações no meio intracelular; ao contrário, a concentração de aminoácidos neutros é significativa e são ligantes de transporte pelo sistema (DEVÉS & BOYD, 1998).

5.3 Cinética do transporte

No transporte facilitado através da membrana celular o substrato combina-se com a proteína carreadora para formar um complexo e, como resultado, o substrato torna-se capacitado para cruzar a membrana celular. Este comportamento é muito semelhante ao de várias enzimas, cujo substrato ao combinar-se com uma enzima forma um complexo, no qual ele, o substrato, é ativado e submetido à alteração química catalisada pela enzima. Quando os centros catalíticos da enzima estão saturados com o substrato, não há aumento na velocidade da reação se mais substrato for adicionado. O sistema atingiu a sua velocidade máxima, ou seja, está saturado (STEIN, 1990; STRYER, 1996).

A cinética dos sistemas de transporte da membrana tem as características semelhantes às enzimas em termos de saturabilidade, especificidade, dependência da concentração da molécula a ser transportada e possibilidade de inibição. Portanto, a equação de Michaelis-Menten, utilizada na cinética enzimática, também é aplicável para sistemas de transporte (LIEB, 1982).

A equação de Michaelis-Menten foi derivada por Leonor Michaelis e Maud Menten em 1913, que desenvolveram uma análise da velocidade de reação enzimática, chamada cinética do estado estacionário. Desta análise surgiram os

parâmetros básicos V_0 , V_{\max} e k_m . V_0 é a velocidade inicial da reação, ou seja, a situação em que a concentração do substrato é constante porque o tempo de reação é suficientemente curto para que não tenha havido consumo significativo de substrato, a ponto de alterar a velocidade subsequente da reação. V_{\max} é a capacidade inicial máxima, o patamar que a velocidade inicial alcança e que aumentos na concentração de substrato não mais repercutem em aumentos da velocidade de reação, porque todas as moléculas da enzima (ou do transportador) já estão ligadas ao substrato. Nestas condições, diz-se que a enzima ou transportador está saturado com o substrato ou ligante – no caso o aminoácido específico -, que daqui por diante será referido por ligante na reação de transporte. k_m é a constante de Michaelis-Menten ou constante de meia-saturação e equivale à concentração de substrato na qual V_0 é igual à metade de V_{\max} . Representa, portanto, a afinidade menor ou maior da enzima ou transportador por seu substrato ou ligante (LIEB, 1982).

A melhor evidência de que algum componente da membrana celular está envolvido no processo de transporte, é encontrada em estudos nos quais este transporte é inibido por um reagente adicionado ao sistema (STEIN, 1990). Estudos com reagente sulfidril não-específico, como o NEM e *p*-sulfonato de cloromercuriobenzeno (PCMBS), têm sido realizados com bons resultados.

O NEM é uma substância muito útil para o estudo do transporte de L-arginina pois inativa o sistema de transporte y^+ . A hipótese de que o NEM é um inibidor de transporte foi testada através da interação do transportador com lisina em eritrócitos humanos. Após o tratamento dos eritrócitos com inibidor, somente o sistema de alta afinidade permaneceu aparente (y^+L), enquanto que o de menor afinidade para entrada de lisina (y^+) foi bloqueado (DEVÉS *et al*, 1993).

A cinética de inativação por NEM é consistente com a modificação de um grupo funcional na proteína de transporte e independe do substrato. Foi proposto

que o NEM reage com um grupo sulfidril localizado na porção interna do carreador, e está envolvido no mecanismo de translocação (DEVÉS & KRUPKA, 1981).

6. Eritrócito como modelo celular em estudo de transporte transmembrana

Os eritrócitos de mamíferos são altamente diferenciados na função básica de transportar oxigênio e dióxido de carbono, apesar de, sob um ponto de vista estrutural, serem as mais simples “células” eucarióticas. Desprovidos de núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, ribossomo, aparelho de Golgi e lisossomo, as hemácias de mamíferos estão livres da complexidade associada aos compartimentos de organelas intracelulares (ELLORY, 1987) e, assim, têm servido de modelo clássico para estudos de transporte através da membrana (CHRISTENSEN & ANTONIOLI, 1969; ELLORY & YOUNG, 1982; DEVÉS *et al*, 1993). Anormalidades inicialmente descritas no transporte eritrocitário de membrana, foram, subseqüentemente, demonstradas ocorrerem também em outros tipos celulares, atestando o valor da hemácia como modelo similar às células mais complexas (YOUNG & ELLORY, 1977; FERVENZA *et al*, 1989; FERVENZA *et al*, 1991; POLI DE FIGUEIREDO *et al*, 1992). Portanto, a hemácia vem sendo, há tempo, utilizada como protótipo para estudos de membrana celular de células mais complexas, sendo modelo favorito dos fisiologistas celulares, inclusive para estudos com proteínas transportadoras de aminoácidos (STEWART & FRICKE, 2003).

Estas células apresentam ainda, outras vantagens: constituir uma população homogênea de células; possuir membrana celular com estrutura bem conhecida e com composição básica semelhante à de outras membranas plasmáticas; ser de

fácil acesso e obtenção; naturalmente corada e pode ser separada com facilidade e rapidez por centrifugação. Por estas razões, o uso de hemácias como modelo para o transporte de íons e/ou moléculas através da membrana celular é amplamente aceito (YOUNG & ELLORY, 1977; STEWART & FRICKE, 2003).

7. A via L-arginina – NO e Doença Hipertensiva Gestacional

A via da L-arginina - NO parece ser importante em diversos aspectos da gestação normal e na fisiopatogenia da PE: adaptações hemodinâmicas, controle da PA, trabalho de parto. Além disso, alterações de permeabilidade da membrana celular envolvendo o transporte da L-arginina já foram sugeridas (FURESZ *et al*, 1991), porém ainda não existe nada definido sobre a natureza das mudanças e da relação destas com a gestação.

O óxido nítrico, juntamente com o GMPc, desempenha um papel crucial na manutenção do tônus vascular. Entretanto a sua produção é dependente da captação de L-arginina circulante (MONCADA *et al*, 1991).

Na literatura os níveis plasmáticos do NO, durante a gestação normal e com pré-eclâmpsia, são diferentes entre os autores. Verifica-se uma grande variação entre as medidas de cada estudo, não se encontrando, aparentemente, uma justificativa para a existência de tal discrepância. Existem estudos que comprovaram aumento (BOCCARDO *et al*, 1996), outros diminuição (SELLIGMAN *et al*, 1994; DAVIDGE *et al*, 1996; BEGUM *et al*, 1996; PODJARNY *et al*, 1997) e, até mesmo, nenhuma alteração (AUGUST & LINDHEIMER, 1995; BAKER *et al*, 1995; NOBUNAGA *et al*, 1996; SCHNEIDER *et al*, 1996; SMÁRASON *et al*, 1997). No nosso meio, Medaglia Filho demonstrou que os nitritos e nitratos

não se alteram com o decorrer da gestação, exceto do segundo para o terceiro trimestre gestacional em primigestas (MEDAGLIA FILHO, 2000).

Ao examinar a rota do NO na célula verifica-se que a deficiência da vasodilatação vascular na PE pode estar relacionada a diversas alterações, como: redução de L-arginina intra ou extracelular, funcionamento da enzima NOS, inibidores endógenos da NOS, problemas ligados ao GMPc, dificuldade de resposta vasodilatadora do endotélio ao NO ou modificações nos sistemas de transporte transmembrana.

Sabe-se que, na gestação normal, o transporte de L-arginina através da membrana plasmática eleva-se com a idade gestacional (GALÃO *et al*, 2004) acompanhando o contratransporte de sódio/lítio que também aumenta (WORLEY *et al*, 1982). Na PE foi descrito alteração no transporte dos íons Na^+/H^+ em plaquetas (GRAHAM *et al*, 1997). Aqui, ao contrário do que ocorre com o NO, os dados são escassos, mas não menos importantes. Sabe-se também, que o perfil lipídico está alterado na PE (LORENTZEN *et al*, 1995), e este fato pode ter implicações na estrutura e, conseqüentemente, na permeabilidade da membrana. Além disso, os níveis séricos dos análogos da L-arginina estão aumentados nesta síndrome (PETTERSSON *et al*, 1998), o que altera a transestimulação do transporte transmembrana, inibindo, invariavelmente a ativação da eNOS. O fato dos níveis séricos de L-arginina serem menores nesta patologia (D'ANIELLO *et al*, 2001) não se relaciona teoricamente com a síntese aumentada de NO.

Estudos realizados no Laboratório de Nefrologia – PUCRS, com intuito de elucidar o envolvimento da rota metabólica L-arginina-NO na fisiopatogenia da PE, avaliaram a permeabilidade transmembrana do aminoácido nesta patologia quando comparada a gestantes normais. Os resultados verificaram que a capacidade máxima de captação eritrocitária de L-arginina (V_{max}) está aumentada

na PE e o parâmetro indicativo de afinidade pelo substrato – k_m – não apresentou diferença entre si (PINHEIRO DA COSTA *et al*, 2004).

Surgiram também idéias controversas sobre a influência do NO na SPE e a associação entre a produção de NO e hipertensão arterial (ARNGRIMSSON *et al*, 1997; CLOSS *et al*, 2000). O aumento do transporte de L-arginina através da membrana celular pode alterar a produção de NO, e estarem relacionados, mais com a hipertensão arterial, do que com a síndrome de PE.

Antonello e colaboradores verificaram um aumento na capacidade máxima de captação da L-arginina em pacientes com PE sobreposta, relativamente a pacientes com “PE pura”, caracterizando um achado do mecanismo de hipertensão *per se* (ANTONELLO, 1998).

Na análise em separado dos sistemas de transporte da L-arginina, verificou-se que o sistema y^+L apresenta uma capacidade máxima de transporte significativamente maior nas pacientes com SPE, em relação às gestantes normais, permitindo deduzir que a alteração do influxo total de L-arginina na SPE pode ser atribuída ao sistema y^+L . O sistema y^+ não apresentou diferença de V_{max} entre os dois grupos, e sim redução da afinidade nas pacientes com SPE. Porém neste estudo não foi realizado, para fins de análise estatística, distinção entre PE “pura” e PE sobreposta (CONCEIÇÃO, 2001; Anexo 1).

Assim, com o intuito de fornecer informações que possam auxiliar na tarefa do entendimento das alterações fisiopatológicas verificadas na via de produção do NO na SPE, surgiu o questionamento que permitiu o delineamento deste estudo: essas alterações no transporte de membrana eritrocitário de L-arginina são próprias da doença hipertensiva da gestação ou estão associadas à hipertensão propriamente dita?

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar a atividade dos transportadores da L-arginina – sistemas y^+ e y^+L - em eritrócitos de mulheres normais e hipertensas, gestantes normais e portadoras de distúrbios hipertensivos da gestação.

2. Objetivos específicos

- Comparar os parâmetros cinéticos dos transportadores da L-arginina em eritrócitos de mulheres normais e hipertensas, gestantes normais e portadoras de distúrbios hipertensivos da gestação.
- Relacionar os parâmetros cinéticos dos transportadores da L-arginina aos dados clínicos e laboratoriais de mulheres normais e hipertensas, gestantes normais e portadoras de distúrbios hipertensivos da gestação.

PACIENTES E MÉTODOS

1. Definições para o trabalho

As definições utilizadas neste trabalho foram:

Gestação: período compreendido entre o momento da fecundação até a expulsão do produto da concepção, maduro ou imaturo. Na mulher este período é datado de aproximadamente 38 semanas a partir da concepção, ou 40 semanas a partir do primeiro dia da última menstruação.

Gestante normal (GN): mulheres com 20 semanas ou mais de gestação, normotensas, sem história ou tratamento de hipertensão arterial, endocrinopatias, nefropatias, hepatopatias ou outras doenças prévias à gestação.

Pressão arterial sistólica (PAS): pressão que se obtém no final da sístole, determinada pelo volume sistólico ventricular esquerdo, a velocidade de ejeção e a distensibilidade das paredes da aorta. É medida no primeiro ruído auscultatório dos sons de Korotkoff (Fase I).

Pressão arterial diastólica (PAD): é determinada pela pressão alcançada durante a sístole, a velocidade do fluxo através da resistência periférica e a duração da diástole. Estabelece-se pela resistência periférica total e frequência cardíaca, refletindo a carga constante que as paredes vasculares suportam ao longo do ciclo cardíaco. É medida no desaparecimento dos sons de Korotkoff (Fase V).

Pressão arterial média (PAM): é o termo médio encontrado no ciclo de uma curva de pressão arterial; este termo é levemente inferior à média aritmética das pressões sistólica e diastólica $(PAS + 2 \times PAD) / 3$.

Hipertensão arterial sistêmica (HAS): pressão arterial sistólica igual ou maior que 140mmHg e pressão arterial diastólica igual ou maior que 90mmHg, consideradas as fases I e V dos sons de Korotkoff, respectivamente.

Proteinúria patológica: excreção urinária de proteína igual ou superior a 0,3g em 24 horas, ou quando a relação proteína e creatinina em amostra de urina for igual ou superior a 0,3.

Doença hipertensiva gestacional (DHG): doença caracterizada por elevação dos níveis tensionais em gestantes que inclui quatro modalidades: PE, PES, HG, HC.

Pré-eclâmpsia (PE): síndrome específica da gestação caracterizada por hipertensão arterial e proteinúria patológica, marcadores que aparecem após a vigésima semana gestacional em mulheres normotensas com fundoscopia e sedimento urinário normais, e desaparecem em até três meses após o parto.

Eclâmpsia (E): definida como a ocorrência de crises convulsivas, não atribuídas a outras causas, em mulheres com pré-eclâmpsia.

Pré-eclâmpsia sobreposta (PES): presença de pré-eclâmpsia em pacientes com hipertensão arterial prévia ou persistente após doze semanas do parto. Em pacientes com hipertensão controlada, há aumento súbito da pressão sanguínea e da proteinúria.

Síndrome de pré-eclâmpsia (SPE): gestantes que iniciaram com hipertensão arterial e proteinúria patológica após a vigésima semana de gravidez e que podem

ser classificadas como pré-eclâmpsia ou pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica.

Hipertensão gestacional (HG): gestante com hipertensão detectada após a vigésima semana de gestação sem proteinúria patológica. A confirmação do diagnóstico ocorre com a normalização da pressão arterial no período de doze semanas após o parto, e então será classificado como hipertensão transitória. Se a pressão arterial elevada persistir após as doze semanas, a paciente será considerada como hipertensa crônica.

Hipertensão crônica (HC): presença de hipertensão arterial em não-gestantes ou presente antes da gestação, que continua após o término da gravidez, ou que aparece antes da vigésima semana gestacional. A hipertensão diagnosticada pela primeira vez durante a gestação, e que não resolve após o parto, é também classificada como hipertensão crônica.

Sistemas de transporte de L-arginina: proteínas denominadas y^+ e y^+L que estão inseridas na membrana plasmática e mediam o transporte de lisina, ornitina, arginina e seus análogos.

Influxo total: taxa de fluxo de entrada realizada simultaneamente pelos dois sistemas de transporte transmembrana.

Capacidade máxima de transporte (V_{max}): é o parâmetro cinético de transporte, obtido a partir da equação de Michaelis-Menten, que expressa a maior capacidade que o sistema é capaz de desempenhar para transferir um ligante de um lado para outro da membrana.

Constante de meia-saturação (k_m): é o parâmetro cinético de transporte, obtido a partir da equação de Michaelis-Menten, que expressa a concentração de ligante necessária para o sistema atingir metade da sua capacidade máxima; é inversamente proporcional a afinidade do transportador pelo ligante.

2. Delineamento

O presente trabalho incluiu mulheres normais e hipertensas, gestantes normais e portadoras de distúrbios hipertensivos da gestação em um momento da gestação, caracterizando-se como um estudo transversal, observacional e prospectivo.

3. Pacientes

Participaram do estudo gestantes normais e com distúrbios hipertensivos gestacionais internadas no Centro Obstétrico e na Unidade de Gestantes de Alto Risco do Serviço de Obstetrícia do Hospital São Lucas da PUCRS e mulheres normotensas e com HAS atendidas no Ambulatório de Nefrologia do Hospital São Lucas da PUCRS.

3.1 Critério geral de inclusão das pacientes

Gestantes com mais de 20 semanas de gestação, datada por última menstruação (DUM) confiável ou por ultra-sonografia (anterior de 12 semanas), sem gestação múltipla, hepatopatias ou endocrinopatias que foram atendidas Centro Obstétrico e na Unidade de Gestantes de Alto Risco do Serviço de Obstetrícia do Hospital São Lucas da PUCRS.

Mulheres normotensas e portadoras de Hipertensão Arterial Sistêmica atendidas no Ambulatório de Nefrologia do Hospital São Lucas da PUCRS.

As mulheres que concordaram em participar da pesquisa, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2), aprovado pelo Comitê de Ética da PUCRS/HSL.

3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo: a) mulheres que pediram sua exclusão; b) que não completaram todas as informações necessárias à análise dos dados; c) que retornaram com alguma patologia diferente dos distúrbios hipertensivos gestacionais e d) que, uma vez classificada como gestante normal, apresentaram uma ou mais cruzes de proteína no exame qualitativo de urina (EQU).

Mulheres com história de diabetes, hepatopatia, tireoideopatia, nefropatia ou qualquer outra patologia, exceto hipertensão arterial sistêmica.

4. Consentimento

Este estudo teve início somente após ter sido aprovado pela Comissão Científica e pelo Comitê de Ética da PUCRS. Todas as mulheres que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2), concordaram com o preenchimento do protocolo de estudo (Anexo 3) contendo dados de anamnese e exames físico e laboratoriais. Consentiram também na coleta de amostras de sangue de 15mL e urina para exames de laboratório.

5. Soluções e Reagentes

As soluções e reagentes empregadas para a realização dos ensaios estão descritas abaixo:

5.1 Solução salina

NaCl - 140 milimolar (mM)

KCl - 5mM

Glicose - 5mM

MOPS - 10mM

pH = 7,4

5.2 Solução de L-arginina

L-arginina 1000 μ M (micromolar) em solução salina – 50 mililitros (mL)

L- [U-¹⁴C] arginina monohidroclorada em 2% etanol (atividade específica: 278 mCi/mmol) - 120 microlitros (μ L)

5.3 N-etilmaleimida

NEM 8mM diluído em etanol 100% - 100 μ L

Água miliQ - 900 μ L

5.4 Líquido de cintilação

Triton X-100 - 300 mL

Tolueno - 700 mL

2,5 difeniloxazoli (POP) - 10 gramas (g)

Fenil-2-oxazolil-benzeno (POPOP) - 0,5 g

Tolueno, POP e POPOP foram agitados por 24 horas e após foi adicionado Triton X-100 e novamente agitado por 30 min.

6. Procedimento

Foram obtidos dados de: idade (anos); raça (branca e não branca); número de gestações; idade gestacional no momento da avaliação (semanas); história pregressa de infecção urinária (sim e não); história pregressa de HA (sim e não) e idade de início da doença (anos); história pregressa de PE (sim e não); história familiar de HA (sim e não); peso (kg); altura (m); índice de massa corporal (IMC); pressões arterial sistólica, diastólica e média (mmHg); hematócrito (%); hemoglobina (g/dL); plaquetas ($\times 10^3/\mu$ L); creatinina sérica (mg/dL); ácido úrico (mg/dL); relação proteinúria (mg/dL) e creatininúria (mg/dL) em amostra única de urina.

A medida da pressão arterial foi realizada com a paciente sentada após 20 minutos de repouso. Foi utilizado esfigmomanômetro com coluna de mercúrio e manguito adequado ao diâmetro do braço (HIGGINS & SWIET, 2001). A Fase I de Korotkoff foi considerada para a medida da pressão sistólica, e para a medida da pressão diastólica, a Fase V. A unidade utilizada foi mmHg (GIFFORD *et al*, 2000).

Todos os exames de análises clínicas foram realizados pelo Laboratório de Patologia do HSL/PUCRS. Dosagens de creatinina sérica (normal 0,5-1,2mg/dL) foram realizadas pelo método de Jaffé sem desproteinização; hematócrito (normal 38-45%), hemoglobina (normal 12-16g/dL) e plaquetas (normal 150000 a 450000/ μ L) foram determinados por contador *Coulter STKS* e ácido úrico (normal 2-6,6mg/dL) por método enzimático-colorimétrico automatizado. As dosagens de creatinina urinária foram realizadas por método automatizado (Mega-Bayer) e a proteinúria foi determinada por método turbidimétrico, com leitura espectrofotométrica. Neste estudo optamos por considerar a relação proteinúria/creatininúria em amostra de urina como valor de proteinúria (GINSBERG, 1983).

Foram obtidos também dados do parto como idade gestacional obstétrica (semanas), peso da placenta (g) e do recém-nascido (g) com os respectivos índices de Apgar nos primeiro e quinto minutos após o nascimento (0 a 10) e sexo do recém-nascido (masculino e feminino). Os recém-nascidos foram classificados quanto ao seu crescimento intra-uterino como segue: adequado (AIG), pequeno (PIG) ou grande para a idade gestacional (GIG), segundo a classificação de peso e idade gestacional dos recém-nascidos do Centro Médico da Universidade do Colorado (BALLARD *et al*, 1991).

A avaliação dos parâmetros cinéticos (V_{max} e k_m) de transporte da L-arginina em eritrócitos foi realizada no Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, em até 6 horas após o preenchimento do

protocolo de inclusão (Anexo 3) e coleta da amostra de sangue, conforme técnica de influxo descrita a seguir.

7. Influxo da L-arginina em eritrócitos

A metodologia empregada foi revisada por Young e Ellory em 1982, e permite a análise dos movimentos da L-arginina através da membrana celular (YOUNG & ELLORY, 1982). O uso do NEM para identificação dos dois sistemas de transporte foi revisado por Devés em 1993 (DEVÉS *et al*, 1993).

O sangue coletado das gestantes em frasco contendo 5 μ L de heparina 5000UI/mL foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos para separar o plasma e estocá-lo a -80°C. Após aspiração com bomba a vácuo, o plasma, leucócitos e plaquetas foram removidos. Os eritrócitos foram lavados e centrifugados (3000 rpm, 2min) por 3 vezes em solução salina a 4°C. Finalmente, a suspensão de hemácias em solução salina, com hematócrito variando entre 7 e 12%, foi repartida em duas amostras, sendo cada parte destinada aos ensaios do influxo total e influxo do y⁺L.

7.1 Influxo total

O influxo total foi realizado com concentrações de L-arginina marcada com ¹⁴C que variaram de 8,8 a 300 μ M. Primeiramente, colocou-se a solução do aminoácido (1111 μ M) em tubos de centrifugação em quantidades variáveis, que foram complementadas por solução salina para 325 μ L. Após, adicionou-se 225 μ L de suspensão de eritrócitos, perfazendo volume final de 650 μ L em cada tubo. Todos estes passos foram realizados com a estante mantida em banho-de-gelo (4°C). O fluxo foi iniciado, então, pela incubação dos tubos em banho-maria (37°C)

por 3 minutos e interrompido em banho-de-gelo. Mantidas a 4°C, foi iniciada a lavagem das células com SS seguido de agitação dos tubos, centrifugação (13000 rpm, 5 seg) e aspiração do sobrenadante por 3 vezes, para remover o conteúdo extracelular marcado. As células foram então lisadas com 250µL de Triton, e as proteínas precipitadas com a mesma quantidade de ácido tricloroacético; estes dois passos foram intercalados por agitação. Os tubos foram centrifugados (13000 rpm) por 5 minutos para formação de sedimento. O sobrenadante foi transferido para tubos de contagem de radioatividade β com adição de 4,5mL de líquido de cintilação. A atividade radioativa da ¹⁴C-L-arginina intracelular foi medida pelo analisador de cintilação líquida Beckman LS6500 e expressa em cintilações por minuto (cpm).

Paralelamente a cada ensaio, foram preparados dois tubos de cintilação: um contendo as soluções de triton, ácido tricloroacético e líquido de cintilação para controle das soluções utilizadas no ensaio, e outro com os mesmos reagentes mais 20 µL de solução de ¹⁴C-L-arginina como referência da radiatividade da referida solução.

O influxo, representado pela quantidade de L-arginina (µmol) que um litro de células é capaz de captar no período de uma hora, foi corrigido para esta unidade pelo seguinte cálculo:

$$[(\text{cpm}_a \times 0,020 \times 20 \times 1000) / \text{cpm}_p] / [\text{Hct} \times 0,4] / 100 = \mu\text{mol/L de céls/h}$$

onde:

cpm_a = contagens por minuto de cada tubo

20 µL = volume de solução de L-arginina ¹⁴C (molaridade conhecida)

cpm_p = contagens por minuto do tubo padrão

20 = fator de correção de tempo (de 3 min para 1h)

1000 = fator de correção do volume de células para litro

Htc = hematócrito em %

100 = fator de correção do hematócrito

0,225 = volume de células de cada tubo (mL)

Os dados de influxo foram plotados na ordenada de um gráfico em função das concentrações de substrato inicialmente estabelecidas. A curva foi submetida à equação cinética de Michaelis-Menten com o uso do software Enzfitter (programa de análise função enzimática) para MS-DOS que determinou os parâmetros de máxima capacidade de influxo (V_{\max}) e constante de meia saturação (k_m).

7.2 Influxo do y^+L

Este ensaio foi realizado simultaneamente ao *influxo total*. Para se verificar o influxo do sistema y^+L , foi adicionado solução de NEM 8mM imediatamente antes dos eritrócitos entrarem em contato com a ^{14}C -L-arginina, conforme descrito no artigo submetido (Anexo 4) que propõem uma alteração na técnica descrita por Devés (DEVÉS *et al*, 1993). Após realizou-se os passos seguintes conforme técnica previamente descrita.

Os dados de influxo dos tubos com NEM (influxo pelo sistema y^+L) foram subtraídos dos tubos sem o uso do bloqueador (influxo total). Estes resultados também foram submetidos ao Enzfitter, o qual forneceu a atividade sistema y^+ .

7.3 Exemplo de uma curva de influxo eritrocitário de L-arginina

O gráfico abaixo corresponde ao influxo da L-arginina através da membrana celular de eritrócitos. No eixo da abscissa (X) está representada a

concentração da L-arginina, em μmolar , e no eixo da ordenada (Y) o influxo propriamente dito, em $\mu\text{mol/L de céls/h}$. Cada um dos seis pontos que formam a curva, representa o fluxo na sua respectiva concentração, dado pela média de duplicatas.

Neste estudo foram realizados, laboratorialmente, influxos total e do sistema y^+L , este último obtido através do uso do inibidor NEM. A curva do sistema y^+ foi obtida através da subtração dos influxos total e y^+L .

A Figura 2 mostra um exemplo de curva correspondente aos sistemas em estudo.

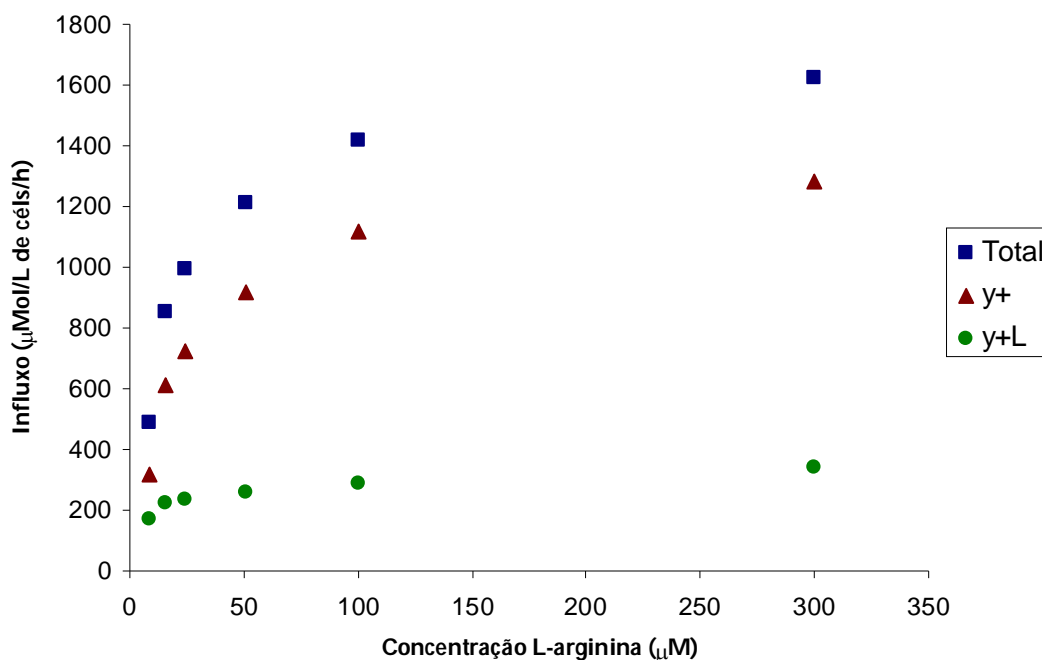


Figura 2. Influxos de L-arginina total e nos sistemas de transporte y^+ e y^+L (curva hipotética).

8. Análise estatística

Os dados categóricos foram descritos por frequência e como porcentagens.

As variáveis contínuas foram descritas por média e desvio padrão.

Para variáveis categóricas, os grupos foram comparados pelo teste do qui-quadrado ou teste exato de Fischer.

Para comparação de variáveis contínuas, usou-se regressão linear simples ou múltipla seguidas de ANOVA e teste *post-hoc* (Tukey) para localização das diferenças.

Para examinar as correlações lineares entre variáveis quantitativas utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson, com sua significância determinada através do teste *t*.

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

O programa utilizado como banco de dados foi o Microsoft Excel e, na análise, utilizou-se o pacote estatístico *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS versão 11 para Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

9. 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 (SPECTOR, 2001), sendo que as referências bibliográficas seguiram as normas da ABNT e as citações indicadas no texto por Sobrenome, Ano.

O presente estudo é parte integrante da linha de pesquisa do Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS que investiga os distúrbios hipertensivos ligados à gestação e a via L-arginina-NO.

A execução do trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS pela autora e contou com a colaboração das colegas Priscilla Barcellos de Almeida e Silvana Lunardini Alves.

A seleção e coleta do material foram realizadas pela autora e contou com a colaboração dos alunos de iniciação científica: André Poils Fay, Antonella Furquim Conte, Caroline Schröer, Daniele Escouto, Fabiane Bisinela, Florência Ferreira Barreiro, Giovana De Nardo Maffazioli, João Paulo Leal Schambeck, Kiele Hoffmann, Mateus Alexandretti, Márcia Nalepinski, Mariana Ambros, Marta Hentschke, Renata Farinon.

No Laboratório de Nefrologia a autora desenvolveu várias atividades relacionadas à investigação clínica das doenças hipertensivas gestacionais. Essas atividades estão ligadas à implantação do Ambulatório de Hipertensão, confecção dos protocolos de atendimento da primeira consulta (Anexo 5) e retorno (Anexo 6), criação de banco de dados e contínuo registro de dados.

A assessoria bioestatística foi realizada pelo Dr. Mário Bernardes Wagner.

Esta tese é apresentada nos seguintes capítulos: Introdução, Objetivos, Pacientes e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões, Referências Bibliográficas e Anexos. Entre os anexos estão apresentados o artigo referente ao estudo dos sistemas de transporte de L-arginina na SPE (Anexo 1), um artigo referente a questões metodológicas da avaliação da cinética de transporte e seu inibidor (Anexo 4) e a versão inicial dos resultados apresentados nesta tese (Anexo 7).

10. Ambulatório de Hipertensão Gestacional

O Ambulatório de Nefrologia/Hipertensão Gestacional é vinculado às atividades docentes do Serviço 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 305 do Hospital São Lucas da PUCRS.

A atividade desenvolvida pela autora 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 da 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, foram desenvolvidos protocolos de atendimento ambulatorial para consulta inicial (Anexo 5) e de retorno (Anexo 6), em colaboração com o Dr. Giovani Gadonski e os alunos de iniciação científica, revisado pelo orientador, que tem como objetivo instruir os alunos na busca das informações mais relevantes. Os dados coletados são armazenados no programa Access 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 cerca de 122 pacientes (primeiras consultas), sendo revistas em consultas regulares, totalizando cerca de 423 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 de 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 orientações em pesquisas. Essa atividade é reconhecida como Estágio de Docência.

RESULTADOS

1. Características demográficas e clínicas

A amostra inicial foi composta por 145 pacientes divididas em 7 grupos: pré-eclâmpsia, pré-eclâmpsia sobreposta, hipertensão gestacional, gestantes com hipertensão crônica, gestantes normais, mulheres não-gestantes hipertensas e normotensas.

No entanto, para fins de análise estatística, a amostra constou de 137 mulheres. Foram excluídas 8 mulheres do estudo: uma mulher não-gestante com hipertensão arterial crônica por apresentar proteinúria patológica durante acompanhamento ambulatorial; uma gestante normal que apresentou feto morto com 23 semanas de gestação; e 6 mulheres por apresentarem falta de dados para análise estatística.

O grupo das gestantes foi composto de 99 pacientes e foram classificadas da seguinte maneira:

PE: gestantes com pré-eclâmpsia (n=39)

PES : pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica (n=8);

HG: gestantes com hipertensão gestacional (n=14);

HC: gestantes com hipertensão crônica (n=10);

GN: gestantes com evolução normal (n=28).

O grupo das não-gestantes foi composto por 38 mulheres e classificado em:

NG/HAS: não-gestantes com hipertensão crônica (n=20);

NG/N: não-gestantes normotensas (n=18).

A Tabela 1 mostra a distribuição das mulheres envolvidas no estudo de acordo com cada grupo.

Tabela 1. Distribuição das mulheres do estudo.

Grupos	Siglas	n
Pré-eclâmpsia	PE	39
Pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica	PES	8
Hipertensão gestacional	HG	14
Hipertensão crônica	HC	10
Gestante Normal	GN	28
Não-gestante com hipertensão crônica	NG/HAS	20
Não-gestante normal	NG/N	18
Total		137

Uma paciente das gestantes normais apresentou diagnóstico de síndrome antifosfolipídica durante avaliação após o parto, mas não foi excluída do estudo porque o influxo de L-arginina apresentou comportamento semelhante aos demais do grupo.

A média da idade das pacientes apresentou diferença estatisticamente significativa entre o grupo de PE e NG/HAS. No grupo das pacientes com PE a idade variou de 16 a 41 anos, no da PES de 25 a 41 anos, no HG de 20 a 45 anos, no HC de 26 a 45 anos, no GN de 14 a 43 anos, no das mulheres não-gestantes a idade variou de 18 a 46 anos nas hipertensas e de 20 a 45 nas normotensas.

Quanto ao tipo racial verificou-se uma diferença significativa entre o grupo das NG/N quando comparado com as mulheres dos grupos PE, PES, HG, GN e NG/HAS.

Verificou-se diferença estatisticamente significativa no número de gestas entre o grupo NG/N quando comparado com NG/HAS, PE, HG e HC.

O grupo das gestantes com PE apresentou 19 pacientes primigestas (52,8%), entre as gestantes com PES 2 primigestas (25%), o das hipertensas gestacionais apresentou 4 primigestas (30,8%), uma paciente no das hipertensas crônicas (11,1%) e 13 no das gestantes normais (52%). No grupo das mulheres não-gestantes, 1 era hipertensa nulípara (5,6%) e 12 normotensas nulíparas (66,7%).

Os valores de peso, altura, IMC, PAS, PAD, PAM, hematócrito, hemoglobina, creatinina, ácido úrico e relação proteinúria/creatininúria em urina de amostra tiveram diferença significativa entre os grupos, principalmente quando comparados os grupos com hipertensão arterial e normotensos.

Estes dados estão todos apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Características demográficas e clínicas dos grupos estudados.

Variável (unidade)	PE (n=39)	PES (n=8)	HG (n=14)	HC (n=10)	GN (n=28)	NG/HAS (n=20)	NG/N (n=18)	p** (Anova)
Idade (anos)*	26,0±5,9 ^a	33,5±6,2	31,3±8,8	31,1±5,8	28,1±7,7	32,2±7,7 ^b	29,7±7,5	0,015
Raça B (n/%)	22/62,9% ^b	3/37,5% ^b	8/61,5% ^b	3/33,3%	17/81% ^b	14/70% ^b	18/100% ^a	0,004
Gestas (n)*	2,2±2,1 ^b	2,6±1,2	3,7±2,8 ^b	3,2±2,3 ^b	2,1±1,6	2,6±1,8 ^b	0,6±0,9 ^a	0,001
IG (sem)*	35,3 ±4,2 ¹	31,6 ±5,6 ^a	37,6 ±3,0 ^b	35,9 ±3,3	39,1 ±2,2 ^{b,2}			<0,001
Peso (kg)	76±14 ^a	76±13	90±18 ^{b,2,B}	94±14 ^{b,2,B}	74±12 ¹	79±17 ^B	61±10 ^{b,A}	<0,001
Altura (m)	1,60 ±0,06	1,60 ±0,03	1,60 ±0,06	1,60 ±0,04	1,59 ±0,07	1,58 ±0,05 ^a	1,64 ±0,07 ^b	0,033
IMC*	29±3,5 ^{b,1}	30±5,7 ^b	35±5,8 ^{b,2,B}	37±5,5 ^{b,2,B}	29±5,3 ^{b,A}	32±6,3 ^b	22±3,4 ^a	<0,001
PAS (mmHg)*	157 ±19,4 ^{b,2,B}	163 ±13,4 ^{b,2,B}	157 ±14,0 ^{b,2,B}	156 ±24,0 ^{b,2}	121 ±14,8 ^{1,B}	139 ±19,5 ^{b,2,A}	113 ±10,7 ^a	<0,001
PAD (mmHg)*	102 ±13,3 ^{b,2}	108 ±18,2 ^{b,2}	99 ±10,7 ^{b,2}	98 ±19,9 ^{b,2}	78 ±11,3 ¹	93 ±11,6 ^{b,2}	72 ±9,3 ^a	<0,001
PAM (mmHg)*	120,4 ±14,4 ^{b,2,B}	126,5 ±14,9 ^{b,2,B}	118,3 ±9,8 ^b	117,0 ±21,0 ^{b,2}	90,4 ±15,8 ¹	108,2 ±13,3 ^{b,2,A}	85,6 ±9,0 ^a	<0,001
Hct (%)*	34,7±3,3 ^{b,2}	36,1±2,9	34,6±4,3 ^b	35,6±3,2	32,5±2,9 ^{b,2}	37,6±2,7 ¹	38,4±2,5 ^a	<0,001
Hb (g/dL)*	11,7 ±1,2	12,5 ±0,9 ^b	11,5 ±1,5	11,9 ±1,5	10,8 ±1,2 ^a	12,4 ±1,1 ^b	12,8 ±0,8 ^b	<0,001
Plaquetas (μL)	220931 ±58232	230000 ±104045	223182 ±73346	226833 ±55090	196667 ±53776	272118 ±76403	240500 ±53209	0,213
CR (mg/dl)*	0,82 ±0,11 ^b	0,80 ±0,12	0,75 ±0,07 ^{b,1}	0,83 ±0,13	0,76 ±0,11 ^b	0,94 ±0,14 ^a	0,91 ±0,11 ²	<0,001
AU (mg/dL)*	4,9±0,9 ^a	4,2±1,1	4,5±1,1	4,5±1,2	4,4±0,7	4,7±1,3	3,7±0,8 ^b	0,045
P/C 24h *	1,40 ±1,79 ^a	1,43 ±1,77 ^a	0,19 ±0,07 ^b	0,19 ±0,06 ^b		0,14 ±0,06 ^b		0,003

* média ± desvio padrão; ** probabilidade estatística; n/% = frequência absoluta e percentual no grupo estudado (casos válidos); PE = grupo pré-eclâmpsia; PES = pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica; HG = hipertensão gestacional; HC = hipertensão crônica; GN = grupo de gestantes normais; NG/HAS = não-gestantes com hipertensão crônica; NG = não-gestantes normotensas; Raça B = branca; IG = idade gestacional no momento da avaliação, em semanas; IMC = índice de massa corporal; PAS = pressão arterial sistólica em mmHg; PAD = pressão arterial diastólica em mmHg; PAM = pressão arterial média em mmHg; Hct = hematócrito, normal 38-45%; Hb = hemoglobina, normal 12-16g/dL; Plaquetas = normal 150-450000/μL; CR = creatinina, normal 0,5-1,3 mg/dL; AU = ácido úrico, normal 2-6,6 mg/dL; P/C 24h = relação proteinúria/creatininúria em urina de amostra, proteinúria patológica = >0,3. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por pares de índices diversos da seguinte forma: a X b; 1 X 2; A X B.

As mulheres envolvidas no estudo apresentaram uma distribuição homogênea entre os grupos quanto a história de infecção do trato urinário sendo: 13 no grupo da PE, 2 no grupo da PES, 5 no das HG, 4 nas HC, 11 nas GN, 7 nas mulheres não-gestantes hipertensas e 8 nas normotensas.

No grupo das pacientes com PE 2 pacientes apresentaram infecção urinária na infância, 10 na idade adulta e 2 em ambas, enquanto no grupo da PES 2 apresentaram ITU na idade adulta. No grupo das HG (n=5), HC (n=4), NG/HAS (n=7) e NG/N (n=6) as pacientes apresentaram infecção somente na idade adulta. No grupo das GN uma paciente apresentou infecção na infância, 9 apresentaram na idade adulta e 1 em ambas as idades.

A história de pré-eclâmpsia em gestações anteriores foi mais freqüente no grupo de HG (n=13 de 14 gestantes) do que no grupo de PE (n=7 de 38 gestantes), PES (n=2 de 8 pacientes), HC (n=4 de 10 pacientes) e NG/HAS (n=11 de 20 mulheres). No grupo de gestantes normais este dado foi relatado por 2 pacientes das 28 que compunham a amostra.

Quanto a idade de início da HAS em pacientes previamente hipertensas a variação foi de: 17 a 36 anos na PES ($26,2 \pm 6,8$), 14 a 36 anos na hipertensão crônica ($23,6 \pm 8,2$) e 12 a 43 anos nas não-gestantes hipertensas ($25,4 \pm 9,3$).

A presença de história familiar de HAS foi elevada e semelhante nos grupos de não-gestantes hipertensas e normotensas (95 e 94,4% respectivamente). No grupo das gestantes a freqüência também foi alta e semelhante (77,4% na PE; 83,3% na PES, 75% na HG; 88,9% na HC e 66,7% na GN).

No grupo das pacientes com PE e HG todas medicadas estavam em uso de metildopa e uma delas com associação de hidralazina. Entre as pacientes com PES e com HC também houve predominância do uso de metildopa, mas foi registrado outras drogas como nifedipina, atenolol, captopril, hidralazina, enalapril, diltiazem

e diurético. Já no grupo das não-gestantes hipertensas a droga mais freqüente foi enalapril associado ou não com hidroclorotiazida, anlodipino, metildopa, hidralazina, captopril e propranolol.

Com relação aos dados perinatais, a Tabela 3 apresenta dados do parto e dos recém-nascidos das gestantes incluídas no estudo.

No grupo da PES uma paciente teve a gestação interrompida porque desenvolveu a forma HELLP da doença.

Como o esperado, os recém-nascidos de GN apresentaram peso maior, decrescendo na seguinte ordem de grupo HG, HC, PE e PES.

A média do peso da placenta foi mais alta no grupo da HG seguido por GN, HC, PE e PES.

Quanto a classificação dos recém-nascidos houve predominância de bebês adequados para idade gestacional (AIG) em todos os grupos das gestantes (PE=67,6%, PES=83,3%, HG=84,6%, HC=66,7% e GN=60,9%). Ocorreram nascimentos de recém nascidos grandes para idade gestacional (GIG) predominantemente nos grupos de PE (24%) e GN (30%).

A maior causa de parto cesárea nas gestantes que apresentaram hipertensão foi a própria elevação da pressão arterial sendo: 54% no grupo da PE, 50% na PES, 50% na HC. A exceção foi o grupo de HG onde predominou a falha de indução de parto normal (13%) e desproporção céfalo-pélvica (13%). Entre as gestantes normais as causas mais freqüentes foram: falha de indução (7%), complicação materna (7%) e desproporção céfalo-pélvica (7%). Outras causas ainda citadas foram: pós-datismo, multiparidade, parto eletivo, parto cesárea prévio e feto pélvico.

Tabela 3. Dados do parto e dos recém-nascidos das gestantes estudadas.

Variável (unidade)	PE (n=39)	PES (n=8)	HG (n=14)	HC (n=10)	GN (n=28)	p** (Anova)
PC (n/%)	27/ 73%	6/ 85,7%	7/ 53,8%	6/ 66,7%	9/ 39,1%	0,004
RN F (n/%)	18/ 50%	1/ 20%	4/ 30,8%	5/ 55,6%	10/ 41,7%	0,531
IGP*	36,6 ±3,5 ^b	36,8 ±2,4 ^b	39,2 ±1,5	36,8 ±2,6 ^b	39,4 ±2 ^a	0,009
APGAR 1*	7,8± 2,0	7,2 ±1,6	8,1 ±1,5	8,5 ±0,5	7,9 ±1,7	0,602
APGAR 5*	9,0 ±1,2	9,0 ±0,6	9,3 ±0,8	9,5 ± 0,5	9,2 ±0,8	0,590
Peso RN* (g)	2528 ±863 ^a	2247 ±935 ¹	3321 ±393 ^{b,2}	2984 ±756	3449 ±662 ^{b,2}	<0,001
Peso placenta* (g)	524 ±174 ^a	489 ±205	722 ±160 ^b	648 ±178	664 ±185 ^b	0,002

* média ±desvio padrão; ** probabilidade estatística; n/% = frequência absoluta e percentual no grupo estudado (casos válidos); PE = grupo pré-eclâmpsia; PES = pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica HG = hipertensão gestacional; HC = hipertensão crônica; GN = grupo de gestantes normais; PC = parto cesárea; RN F = recém-nascido do sexo feminino; IGP = idade gestacional pediátrica em semanas; APGAR 1 = APGAR no primeiro minuto; APGAR 5 = APGAR no quinto minuto; Peso em gramas. As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por pares de índices diversos da seguinte forma: a X b; 1 X 2; A X B.

2. Reprodutibilidade

Foram coletados duas amostras de sangue de três mulheres não-gestantes e realizado influxos de L-arginina em separado, a fim de testar a reprodutibilidade dos resultados dos ensaios. A Figura 3 mostra os influxos destas mulheres.

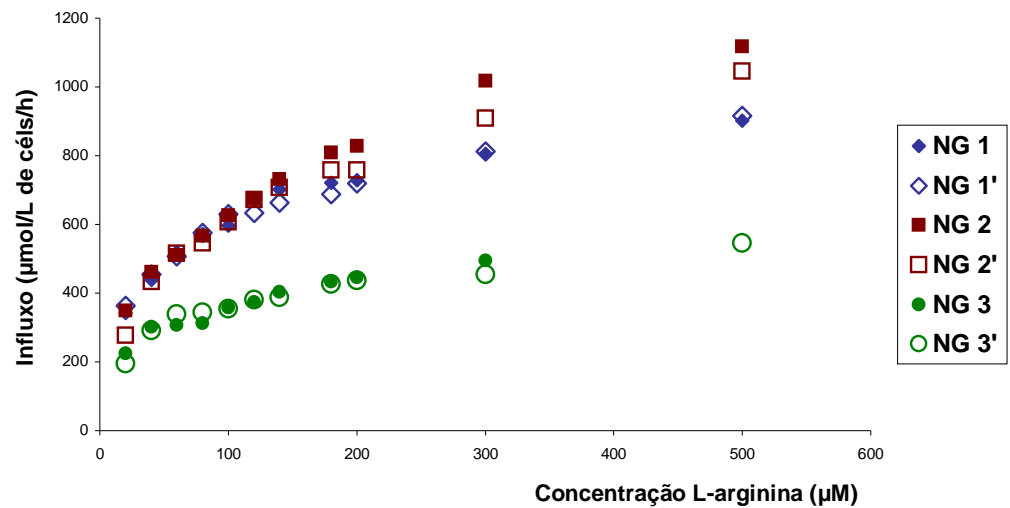


Figura 3. Reprodutibilidade dos ensaios em duplicata de influxos de L-arginina em eritrócitos de três mulheres não-gestantes.

Para a determinação dos coeficientes de variação intra-ensaio empregou-se a fórmula:

$$CV = (DP/X) \cdot 100$$

onde: CV=coeficiente de variação

DP=desvio padrão

X=valor médio das constantes cinéticas

Tabela 4. Reprodutibilidade dos influxos através da variação das constantes cinéticas de transporte (V_{max} e k_m) em três amostras de eritrócitos humanos.

Amostra	V_{max}	k_m	Amostra	V_{max}	k_m	Amostra	V_{max}	k_m
1	927	45,8	2	1258	89,7	3	508	34,3
1'	910	43,8	2'	1139	80,1	3'	530	38,5
Média	918,5	44,8	Média	1198,5	84,9	Média	519	36,4
DP	12	1,4	DP	84,1	6,8	DP	15,6	3,0
CV	1,3	3,2	CV	7,0	8,0	CV	3,0	8,2

V_{max} ($\mu\text{mol/L}$ de cels/h); k_m ($\mu\text{M/L}$); DP=desvio-padrão; CV=coeficiente de variação (%)

O coeficiente de variação do V_{max} oscilou entre 1,3 a 7,0 %, e do k_m entre 3,2 e 8,2%, como demonstra a Tabela 4.

3. Captação eritrocitária da L-arginina

Os resultados de capacidade máxima de transporte (V_{max}) e da constante de meia saturação (k_m) nos grupos estudados constam das Tabelas 5 e 6 e estão ilustradas nas Figuras 4 e 5 respectivamente.

Observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros cinéticos quando analisados os sistemas de transporte em conjunto ($V_{max}T$).

O sistema y^+ mostrou-se diferente estatisticamente na capacidade máxima de transporte ($V_{max}y^+$) no grupo das NG/N quando comparado com os grupos PE, HG e GN.

No sistema y^+L não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto a capacidade máxima de transporte ($V_{max}y^+L$).

Tabela 5. Capacidade máxima do transporte eritrocitário da L-arginina total e dos sistemas y^+ e y^+L - V_{max} – nas mulheres estudadas.

Grupos	V_{max} ($\mu\text{mol/L de céls/h}$)*		
	Total	y^+	y^+L
PE (n=39)	1325 \pm 431	949 \pm 356 ^b	351 \pm 140
PES (n=8)	1307 \pm 358	918 \pm 443	493 \pm 247
HG (n=14)	1458 \pm 591	879 \pm 473 ^b	380 \pm 189
HC (n=10)	1239 \pm 295	906 \pm 289	313 \pm 83
GN (n=28)	1276 \pm 382	894 \pm 332 ^b	413 \pm 186
NG/HAS (n=20)	1443 \pm 605	1082 \pm 553	385 \pm 205
NG/N (n=18)	1607 \pm 681	1344 \pm 576 ^a	371 \pm 185
p** (Anova)	0,323	0,017	0,349

* média \pm desvio padrão; ** probabilidade estatística; PE = grupo de pré-eclâmpsia; PES = pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica; HG = hipertensão gestacional; HC = hipertensão crônica; GN = grupo de gestantes normais; NG/HAS = não-gestantes com hipertensão crônica; NG = não-gestantes normotensas; GN = grupo de gestantes normais; Total = V_{max} total; y^+ = V_{max} do sistema y^+ ; y^+L = V_{max} do sistema y^+L . As diferenças estatisticamente significativas estão assinaladas por pares de índices.

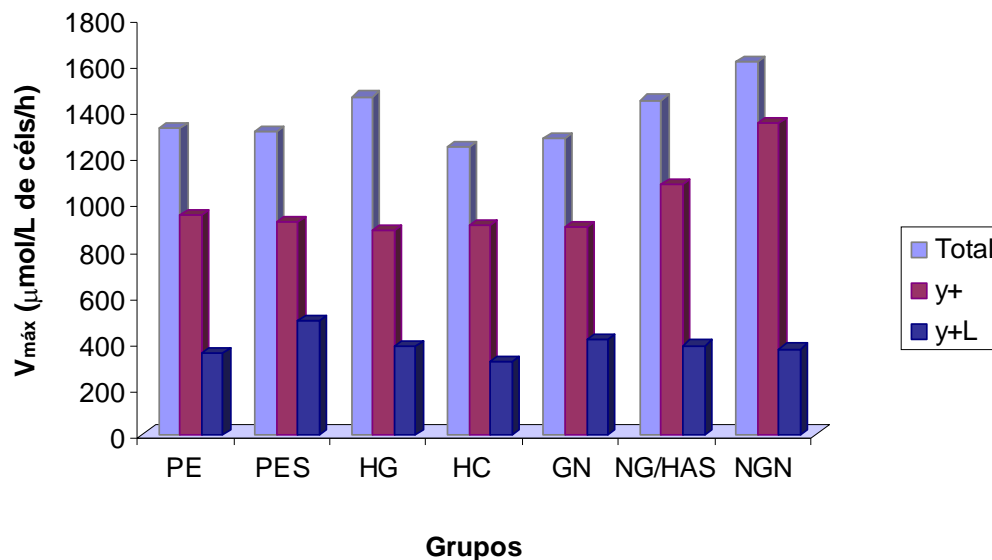


Figura 4. Capacidade máxima do transporte eritrocitário total e dos sistemas y^+ e y^+L da L-arginina - V_{\max} ($\mu\text{mol/L}$ de céls/h) - nos grupos estudados: PE = pré-eclâmpsia (n=39); PES = pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica (n=8); HG = hipertensão gestacional (n=14); HC = hipertensão crônica (n=10); GN = grupo de gestantes normais (n=28); NG/HAS = não-gestantes com hipertensão crônica (n=20); NG = não-gestantes normotensas (n=18).

A constante de meia saturação do influxo total (k_mT) e do sistema y^+ (k_my^+) não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

No sistema y^+L houve diferença estatisticamente significativa (k_my^+L), no entanto não foi possível identificar especificamente entre quais grupos.

Tabela 6. Avaliação da constante de meia saturação do transporte eritrocitário total e dos sistemas y^+ e y^+L da L-arginina – k_m – nas mulheres estudadas.

Grupos	k_m ($\mu\text{mol/L}$)*		
	Total	y^+	y^+L
PE (n=39)	89,3 \pm 44,9	99,9 \pm 49,5	64,6 \pm 44,4
PES (n=8)	91,6 \pm 37,1	120,1 \pm 73,1	89,4 \pm 58,2
HG (n=14)	81,1 \pm 35,2	75,8 \pm 47,7	41,6 \pm 23
HC (n=10)	73,7 \pm 30,8	84,2 \pm 30,3	41,6 \pm 26,9
GN (n=28)	95,6 \pm 39,1	110,7 \pm 56,3	87,7 \pm 54,8
NG/HAS (n=20)	93,9 \pm 34	113,2 \pm 52,4	64,9 \pm 49,3
NG/N (n=18)	85,5 \pm 28,9	127,3 \pm 78	56,7 \pm 55,2
p** (Anova)	0,728	0,155	0,026

* média \pm desvio padrão; ** probabilidade estatística; PE = grupo de pré-eclâmpsia; PES = pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica; HG = hipertensão gestacional; HC = hipertensão crônica; GN = grupo de gestantes normais; NG/HAS = não-gestantes com hipertensão crônica; NG = não-gestantes normotensas; GN = grupo de gestantes normais; Total = k_m total; y^+ = k_m do sistema y^+ ; y^+L = k_m do sistema y^+L .

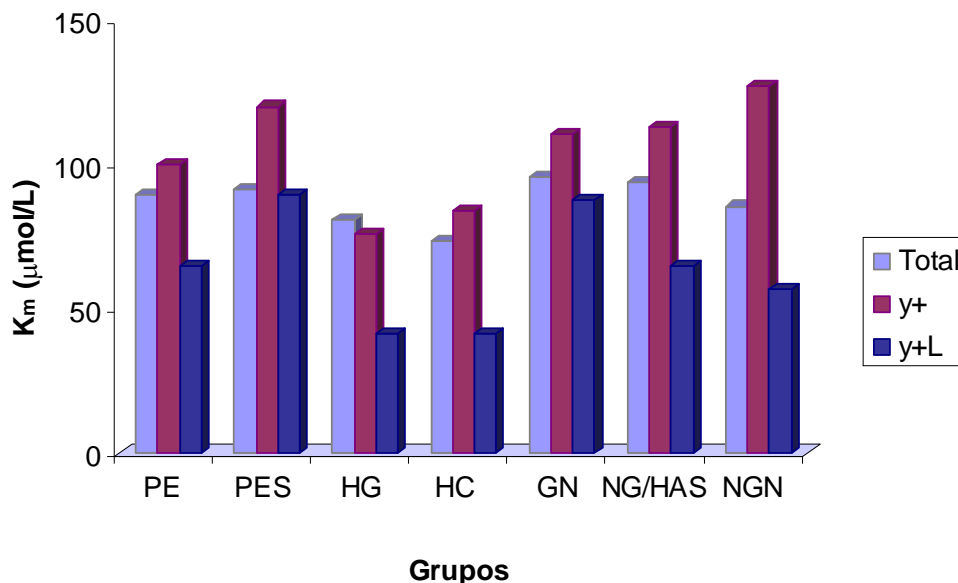


Figura 5. Constante de meia saturação do transporte eritrocitário da L-arginina total e dos sistemas y⁺ e y^{+L} - k_m (µmol/L) – nos grupos estudados: PE = pré-eclâmpsia (n=39); PES = pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica (n=8); HG = hipertensão gestacional (n=14); HC = hipertensão crônica (n=10); GN = grupo de gestantes normais (n=28); NG/HAS = não-gestantes com hipertensão crônica (n=20); NG = não-gestantes normotensas (n=18).

4. Correlações

As relações entre os parâmetros cinéticos dos influxos total e dos sistemas y^+ e y^+L (V_{\max} e k_m) com os aspectos clínicos e laboratoriais, avaliada por correlação de Pearson, estão apresentadas na Tabela 7.

Não se encontrou correlações com V_{\max} e k_m dos sistemas de transporte, em conjunto e em separado, com os parâmetros IG, Gestas, PAS, PAD, PAM e peso do RN.

Houve correlação estatisticamente significativa entre IG e PAS (-0,457), PAD (-0,356) e PAM (-0,425).

O número de gestações se correlacionou fraca e positivamente com a PAS (0,260), PAD (0,276) e PAM (0,280).

Tabela 7. Coeficiente de correlação de Pearson dos parâmetros cinéticos - V_{\max} ($\mu\text{mol/L}$ de céls/h) e k_m ($\mu\text{mol/L}$) - de influxo total e nos sistemas y^+ e y^+L^- com dados clínicos na amostra estudada (n=137).

Dados	V_{\max}			k_m		
	Total	y^+	y^+L^-	Total	y^+	y^+L^-
IG (sem)	-0,069 p = 0,516	-0149 p = 0,158	-0,027 p = 0,799	-0,001 p = 0,996	-0,089 p = 0,404	0,057 p = 0,588
Gestas (f)	0,024 p = 0,788	-0,026 p = 0,768	-0,040 p = 0,654	0,006 p = 0,943	-0,042 p = 0,639	-0,099 p = 0,270
PAS (mmHg)	0,003 p = 0,974	-0,072 p = 0,418	0,071 p = 0,419	-0,079 p = 0,370	-0,106 p = 0,228	-0,047 p = 0,592
PAD (mmHg)	0,007 p = 0,936	-0,067 p = 0,446	0,118 p = 0,181	-0,044 p = 0,619	-0,050 p = 0,576	-0,014 p = 0,874
PAM (mmHg)	-0,002 p = 0,978	-0,075 p = 0,396	0,094 p = 0,289	-0,067 p = 0,449	-0,079 p = 0,371	-0,026 p = 0,769
Peso RN (g)	-0,070 p = 0,514	-0,167 p = 0,117	-0,002 p = 0,986	0,065 p = 0,545	-0,002 p = 0,982	-0,001 p = 0,994

IG = idade gestacional no momento da avaliação, em semanas; f = frequência absoluta; PAS = pressão arterial sistólica em mmHg ; PAD = pressão arterial diastólica em mmHg; PAM = pressão arterial média em mmHg; Peso em gramas.

DISCUSSÃO

Este trabalho faz parte da linha de pesquisa desenvolvida no Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS que tenta elucidar alguns fatores possivelmente envolvidos na fisiopatogenia desta patologia tão instigante que é a Doença Hipertensiva Gestacional.

Nesta patologia de etiologia ainda desconhecida sabe-se que há presença de dano endotelial e a síntese de fatores moduladores do tônus vascular está alterada. O estudo do transporte do aminoácido L-arginina através da membrana celular pelos dois sistemas de transporte - y^+ e y^+L - visa fornecer dados que possam ser relevantes para o entendimento dos distúrbios hipertensivos gestacionais. Sabe-se que o transportador y^+ desempenha um papel fundamental na produção de NO em vários tipos de células e situações de estresse orgânico (BLOCK *et al*, 1995; KAKUDA *et al*, 1999; AYUK *et al*, 2000; READE *et al*, 2002).

Neste estudo avaliamos os parâmetros cinéticos do transporte total e através das proteínas carreadoras (y^+ e y^+L) da L-arginina pela membrana plasmática em sete grupos distintos: PE, PES, HG, HC, GN, NG/HAS e NG/N. Isto nos permitiu avaliar o funcionamento destes transportadores, buscando separar diferentes condições como a gestação, pressão arterial e os distúrbios hipertensivos da gestação.

Verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa nos sete grupos em relação à capacidade máxima de transporte da L-arginina nos sistemas em conjunto ($V_{max}T$) e no sistema y^+L . Quanto à capacidade de transporte do

sistema y^+ , observou-se que no grupo das NG/N esta é mais elevada em relação ao grupo de GN, e ainda PE e HG.

Em relação ao V_{\max} total, ou seja, a avaliação dos dois sistemas de transporte em conjunto, mesmo que se empregasse o conceito de Síndrome de Pré-Eclâmpsia (PE + PES) comparando-as com gestantes normais, apesar do valor maior, a diferença não seria significativa estatisticamente como encontrada nos estudos de Antonello e Pinheiro da Costa (ANTONELLO *et al*, 1997; PINHEIRO DA COSTA *et al*, 2004). Também divergem do estudo de Antonello no sentido de que a capacidade máxima de transporte total não apresenta diferença significativa entre os grupos de PE e PES. Ainda, não encontramos diferença no V_{\max} total nas outras situações de hipertensão, na gestação e não gestação. Portanto, nosso estudo não confirma a hipótese de que as alterações anteriormente descritas sejam secundárias à hipertensão arterial sistêmica. Na verdade, isso nos remete a uma reflexão da constituição da amostra e do significado destes achados.

O primeiro fator a ser discutido é o fato de alguns grupos avaliados terem apresentado um tamanho amostral reduzido, devido a freqüência do aparecimento das patologias (por exemplo, gestantes previamente hipertensas, hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica) dificultando as análises estatísticas e a busca de significância. Assim, o desequilíbrio do tamanho amostral pode explicar, pelo menos em parte, os resultados da análise estatística. Na análise dos dados do presente trabalho, é importante observar que o valor da diferença do V_{\max} do sistema y^+ das NG/N em relação aos demais grupos incluídos é, por vezes, menor que a diferença absoluta entre outros grupos, no entanto entre estes outros grupos não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas. Por exemplo, NG/N é diferente estatisticamente de PE com uma diferença numérica absoluta de 395, mas não é diferente da PES mesmo com uma diferença numérica absoluta de 426, as diferenças nos desvios-padrões justificam esta avaliação.

A amostra estudada foi heterogênea em vários aspectos: idade, raça, número de gestações, peso, altura e IMC. Particularmente voltamos a atenção para as diferenças nas idades gestacionais, sendo que o grupo de PES apresentou a menor IG. O trabalho de Antonello sugere que as anormalidades do V_{\max} total seriam especificamente neste grupo. É importante salientar que o grupo de gestantes com hipertensão gestacional e crônica e as mulheres não-gestantes com hipertensão crônica não foram avaliadas no estudo de Antonello. Não foram também avaliadas as funções dos sistemas y^+ e y^+L em separado (ANTONELLO, 1998). Parece que os resultados do presente estudo encontram mais respaldo nos achados do estudo de Galão *et al*, o qual mostra que a capacidade máxima de transporte aumenta progressivamente com a evolução da gestação, sugerindo que as modificações encontradas estão associadas à evolução da gestação, mais do que à hipertensão (GALÃO *et al*, 2004).

Outras características demográficas e clínicas poderiam ter influência nos resultados, entretanto estas diferenças caracterizaram os grupos específicos, por exemplo, PAS, PAD, PAM, hematócrito, hemoglobina, ácido úrico, proteinúria. Não conhecemos relatos que avaliem diferenças relativas a idade, raça, número de gestas ou peso, altura e IMC.

Também parece não haver relatos de estudo do transporte da L-arginina na gestação e distúrbios hipertensivos da gestação utilizando eritrócitos como modelo experimental. Redman e colaboradores avaliaram o transporte de L-arginina em células sanguíneas periféricas mononucleares e verificaram que a captação deste aminoácido pelo sistema y^+ está aumentada na gestação normal, mas não na pré-eclâmpsia em pacientes com 34-35 semanas de gravidez predominantemente primíparas (MCCORD *et al*, 2006).

O aminoácido L-arginina, além de estar envolvido com o relaxamento vascular, também é precursor do hormônio do crescimento, proteínas, uréia e

creatinina (WU & MORRIS, 1998). No contexto gestacional o crescimento e desenvolvimento fetal são dependentes de uma adequada provisão de substratos pela circulação materna. Eritrócitos agem como carregadores de aminoácidos de um lado para outro da placenta e os eritrócitos fetais apresentam uma capacidade de captação de NO aumentada (CALATAYUD *et al*, 1998). O papel das células sangüíneas no transporte de aminoácidos inter-órgãos, em associação com o alto fluxo sangüíneo, pode aumentar e tornar mais eficiente a distribuição dos nutrientes (GARIBOTTO *et al*, 2002). Além disso, a habilidade de filtrar dos eritrócitos maternos tem sido sugerida como um indicador do fluxo da microcirculação placentária, que está associado com o peso do RN e afeta o desenvolvimento do feto (KAIBARA *et al*, 1985). Adicionalmente há relato de associação da redução do transporte de L-arginina e síntese de NO com crescimento intra-uterino restrito (CASANELLO & SOBREVIA, 2002). Avaliando os resultados do presente estudo sob esta ótica, parece que na gestação normal há de fato uma maior entrega de aminoácidos pelos eritrócitos, evidenciada pela queda do transporte em relação à mulheres não grávidas, sugerindo que o sistema y^+ , pobremente estimulado pelo baixo conteúdo de L-arginina intracelular, apresentaria uma baixa capacidade de transporte por trabalhar mais lentamente quando comparado às mulheres não-gestantes; este é o conhecido efeito da transestimulação. Há que se considerar ainda a presença intra e extracelular de outros aminoácidos catiônicos ou análogos positivamente carregados, inibidores efetivos do influxo de L-arginina pelo sistema y^+ , como lisina, ornitina, canavanina, N-monometil-L-arginina, arginina dimetil assimétrica (ADMA) e N-iminoetil-L-ornitina (WU & MORRIS, 1998).

Trabalhos mostram que na pré-eclâmpsia os níveis circulantes de ADMA estão aumentados (HOLDEN *et al*, 1998; PETTERSSON *et al*, 1998). Estes inibidores endógenos da NOS, também são transportados pelos sistemas y^+ e y^+L (FORRAY *et al*, 1995; MENDES RIBEIRO *et al*, 1996; DEVÉS & BOYD, 1998). Se os níveis de

compostos intracelulares que utilizam estes sistemas de transporte estão aumentados, o carreador transestimulado aumenta sua velocidade. Estudo realizado em transporte de L-arginina na membrana plasmática em condições de zero-trans mostrou o aumento da capacidade de transporte na SPE se mantém em condições de zero-trans, ou seja, quando se elimina a transestimulação (REITZ, 2001); mostrando que a transestimulação não é responsável pela alteração da capacidade de transporte verificada na SPE. Assim, o achado inicial, quando as células continham seu conteúdo original, persistiu em condições de depleção intracelular de ligante. A constante de meia-saturação, em condições de zero-trans, não se alterou entre os dois grupos de gestantes (REITZ, 2001). Essas evidências contribuem para que a alteração de transporte detectada na pré-eclâmpsia, seja funcional e/ou estrutural. Portanto, o aumento da V_{max} pode refletir um aumento do número de carreadores presentes na membrana, ou aumento de sua eficiência (STEIN, 1990).

O transporte da L-arginina foi previamente estudado na membrana plasmática das microvilosidades do sincitiotrofoblasto da placenta humana. Nesse artigo, o influxo inicial do transporte foi examinado, e não V_{max} e K_m como no presente estudo. O influxo inicial total de L-arginina mostrou correlação negativa com idade gestacional em condições *in vitro*, mas os autores concluíram que, sob condições fisiológicas, o transporte de aminoácidos catiônicos na membrana plasmática destas microvilosidades estaria aumentada entre a 12^a e 41^a semanas de gestação (AYUK *et al*, 2002). Mais recentemente, o mesmo grupo mostrou um aumento no influxo inicial de L-arginina na membrana plasmática das microvilosidades de mulheres pré-eclâmplicas comparado com a de placentas controle (SPEAKE *et al*, 2003). Esses dados concordam com os estudos prévios do nosso grupo que mostraram alterações no influxo da L-arginina em gestantes com SPE.

Acredita-se que sejam vários os determinantes do transporte da L-arginina através da membrana celular na gestação e distúrbios hipertensivos e, até mesmo, nos indivíduos controle, tendo em vista a larga variabilidade encontrada nos fluxos. As diferenças nos nossos achados e de estudos prévios utilizando metodologia semelhante sugerem que os parâmetros cinéticos tenham baixa sensibilidade e especificidade para diagnóstico e/ou avaliação de aspectos fisiopatológicos destas condições.

Outro aspecto para o qual este estudo não foi controlado foi a severidade dos distúrbios hipertensivos. A gestação é um evento que pode servir como um teste de esforço para mulheres e é possível que o número de gestas afetem alguns aspectos das respostas metabólicas e celulares destas grávidas (POLI DE FIGUEIREDO *et al*, 2003; WILLIAMS, 2003). Neste estudo foram incluídas mulheres primíparas e múltíparas, pois a inclusão exclusiva de primíparas resultaria em uma redução drástica do tamanho amostral.

Em estudo prévio da presente autora, a análise em separado dos sistemas de transporte da L-arginina mostrou que o sistema y^+L apresenta uma capacidade máxima de transporte maior nas pacientes com SPE, em relação às gestantes normais, e o sistema y^+ não apresentou diferença de V_{max} entre os dois grupos, e sim redução da afinidade nas pacientes com SPE (CONCEIÇÃO, 2001; Anexo 1). Mesmo assumindo a análise do presente trabalho considerando-se Síndrome de Pré-eclâmpsia (PE + PES) os achados são discordantes entre estes estudos. No presente estudo, o valor absoluto da capacidade máxima de transporte através do sistema y^+L foi maior nas pacientes com PES, porém sem alcançar significância estatística. Já o citado estudo de Redman e colaboradores verificou que o sistema de transporte y^+ não apresentou diferença entre NG e PE, e sim aumento na GN em células sanguíneas periféricas mononucleares. Apesar dos autores terem citado os dados de transporte de L-arginina pelos sistemas, a expressão de um de seus genes (CAT-2 mRNA) não foi detectada nas mulheres não-gestantes, como

também em apenas 3/10 das GN e 8/10 das pré-eclâmpticas (MCCORD *et al*, 2006).

Quanto a constante de meia saturação (k_m) verificou-se que não houve diferença entre os sete grupos tanto para o transporte total de L-arginina quanto para o sistema y^+ . Apesar da análise estatística de variância sugerir a possibilidade de diferença entre os grupos no k_m do sistema y^+L , o teste *post-hoc* não identificou-a. A metodologia que utilizamos para avaliar o transporte de membrana pode ser questionada quanto a sua precisão em determinar o k_m . Os nossos estudos utilizam concentrações elevadas na faixa de saturação do sistema de transporte, porém é possível que, para avaliar afinidade, concentrações bem menores sejam mais adequadas (DEVÉS & BOYD, 1998). Na análise estatística, optou-se por utilizar o teste de ANOVA e a consulta com o profissional estatístico não verificou a presença de assimetria suficiente para indicar a necessidade de transformar os dados a postos (*ranks*) antes da aplicação do ANOVA.

Vários aspectos da via L-arginina – NO parecem ser relevantes nos distúrbios hipertensivos gestacionais. Como precursor do NO, este aminoácido tem um papel importante na manutenção do tônus vascular (IGNARRO, 1990; IGNARRO, 1991; MONCADA *et al*, 1991; NATHAN, 1992), e a produção de NO pode ser dependente da captação acelerada de L-arginina circulante em determinadas situações (HIBBS *et al*, 1990; MONCADA *et al*, 1991; NATHAN, 1992).

Pouco se sabe sobre os fatores que regulam o transporte de L-arginina, em especial na situação de hipertensão da gestação. O transporte de L-arginina no endotélio pode ser estimulado por fator de necrose tumoral, através do mecanismo dependente da proteína cinase C, alterando o V_{max} e não o k_m (PAN *et al*, 1995). Também é sugerido que o transportador de L-arginina e a atividade da NOS, em parte, são reguladas independentemente (PAN *et al*, 1995).

Estudos anteriores verificaram que a velocidade máxima de transporte de L-arginina está aumentada nas pacientes com síndrome de pré-eclâmpsia (ANTONELLO *et al*, 1997; CONCEIÇÃO, 2001; Anexo 1; PINHEIRO DA COSTA *et al*, 2004). Contrário a hipótese inicial de que o transporte do precursor do óxido nítrico estaria diminuído na hipertensão e, conseqüentemente, na Síndrome de Pré-eclâmpsia. Este achado paradoxal – o aumento na capacidade de transportar L-arginina, não estando necessariamente vinculado a maior produção de NO - pode estar associado a um fenômeno de reação contra o estado de vasoconstricção próprio da hipertensão, na tentativa de produzir NO para a vasodilatação (SCHNEIDER *et al*, 1996). Recentemente foi publicado que a atividade da fosfodiesterase está aumentada em gestantes com SPE (PINHEIRO DA COSTA *et al*, 2006) e portanto há nestas pacientes a degradação do GMPc, molécula promotora específica do relaxamento da musculatura vascular. Este pode ser um dos mecanismos ativadores do transporte de L-arginina, o qual por *feedback*, informaria ao transportador que a produção de NO não é adequada para vasodilatação necessária.

A associação entre a produção de NO e hipertensão arterial é amplamente citada na literatura. Na pré-eclâmpsia os níveis de NO são citados como inferiores (SELLIGMAN *et al*, 1994), inalterados (LYALL *et al*, 1995; CONRAD *et al*, 1999) e superiores (SMÁRASON *et al*, 1997) relativamente à gestação normal, e portanto este dado ainda não está bem caracterizado. O NO participa do sistema imune na resposta a estímulos patológicos inflamatórios (PACHER *et al*, 2007). Segundo Redman e colaboradores na pré-eclâmpsia é encontrada uma excessiva resposta inflamatória materna, que possivelmente ativa a iNOS, liberando NO em grandes quantidades por um longo período de tempo (REDMAN *et al*, 1999). Estas considerações, somadas aos efeitos da transestimulação, são consistentes com a diminuição do transporte de L-arginina na gestação e algumas situações de hipertensão gestacional em relação a mulheres não-gestantes sem hipertensão.

Os trabalhos de Redman e colaboradores reforçam a idéia da participação desta via na Doença Hipertensiva Gestacional. O autor demonstrou que na PE, apesar de não aumentar a captação de L-arginina pelo sistema y^+ nas células mononucleares, como acontece nas GN, a expressão de CAT-2mRNA e da iNOS são diferentes, criando situações que poderiam favorecer uma deficiência de arginina facilitando a formação de ânion superóxido e peroxinitrito contribuindo para estresse oxidativo e nitrosativo (MCCORD *et al*, 2006).

Independentemente dos dados de transporte, é interessante perceber que a hipertensão gestacional tem resultados referentes ao parto e ao RN muito semelhantes ao da GN, sugerindo que este grupo seja realmente muito distinto dos distúrbios hipertensivos relacionados a gestação ou a hipertensão crônica. Talvez por isso justifique a dificuldade em estabelecer este diagnóstico e as mudanças propostas na classificação do *National High Blood Pressure Education Program Working Group* de 1997 para 2000 (GIFFORD *et al*, 2000).

As pesquisas em humanos envolvem indivíduos com inúmeras peculiaridades diferentemente dos modelos animais, que avaliam grupos de indivíduos muito semelhantes, as vezes isogênicos, e criados em ambientes idênticos, com as mesmas dietas e os mesmos aspectos estressores, reduzindo fatores de confusão. Neste trabalho não foram controlados os fatores genéticos, dietéticos e ambientais.

A interpretação de alterações fisiopatológicas nos distúrbios hipertensivos da gestação é enormemente complicada pela ausência de uma definição única do que é a PE. Existem múltiplas classificações destes distúrbios e, sendo uma doença sem etiologia definida, corremos o risco de estar estudando patologias diversas dentro de uma classificação (ou múltiplas classificações) sindrômica. Portanto aspectos conceituais podem justificar algumas das aparentes divergências dos dados em diferentes estudos.

O transporte de L-arginina parece estar alterado na SPE ou gestação, fato que não é mostrado neste trabalho, o que não invalida a influência da via da L-arginina-NO nos distúrbios hipertensivos da gestação. Os aspectos acima discutidos parecem ser relevantes para a adequada análise dos resultados do presente estudo, em especial o tamanho amostral. Investigações futuras neste sentido poderão ser muito esclarecedoras do real papel do transporte de L-arginina na hipertensão e gestação, oferecendo elementos para o entendimento da importância da via L-arginina-NO na reatividade vascular.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo nos permitem concluir que:

1. A capacidade máxima de transporte eritrocitário total de L-arginina ($V_{\max T}$) e pelo sistema de transporte y^+L não é diferente entre mulheres normais e hipertensas, gestantes normais e portadoras de distúrbios hipertensivos gestacionais.
2. A capacidade máxima de transporte eritrocitário de L-arginina pelo sistema y^+ ($V_{\max y^+}$) está elevada no grupo das NG/N em relação ao grupo de GN, e ainda PE e HG.
3. A constante de meia saturação do transporte eritrocitário de L-arginina (k_m) não se altera entre os grupos estudados, tanto no transporte total como pelos sistemas y^+L e y^+ .
4. Os parâmetros cinéticos, V_{\max} e k_m , do transporte total e dos sistemas y^+ e y^+L não apresentaram correlação significativa com os seguintes dados: IG, Gestas, PAS, PAD, PAM e peso do RN.

Portanto, o presente estudo não confirma a hipótese de que as alterações anteriormente descritas sejam secundárias à hipertensão arterial sistêmica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINKUGBE, A.; GANT, N. F. & KINKAID-SMITH, P. The hipertensive disorders of pregnancy; Report of a WHO Study Group. World Health Organization, Geneva, p. 17-31, 1987.

ALBERTS, B.; DENNIS, B.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J. D. Estrutura da membrana. In: Alberts, B.; Dennis, B.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Watson, J. D. *Biologia molecular da célula*. São Paulo, Artes Médicas, Cap.10, p. 478-506, 1997.

AL-SALEH, E. A. & WHEELER, K. P. Transport of neutral amino acids by human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 684: 157-171, 1982.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. Hypertension in pregnancy. *ACOG Technical Bulletin*, Washington, 219, p. 1-8, 1996.

ANTONELLO, I.; FERREIRA, T. D. & RODRIGUES, M. R. et al. Preditores de pré-eclâmpsia (PE): avaliação parcial de estudo prospectivo de características e costumes. *J Bras Nefrol*, 12(4), 1990.

ANTONELLO, I. C.; STEIBEL, J.; PINHEIRO, B. E. & POLI DE FIGUEIREDO, C. E. Maximal capacity of erythrocyte L-arginine uptake is increased in preeclampsia. [abstract] *Nephrology*, 3 (S1): 397, 1997.

ANTONELLO, I. C. Transporte de L-arginina através da membrana celular em gestantes com síndrome de pré-eclâmpsia. Tese de Doutorado em Nefrologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil, 1998.

ARNGRIMSSON, R.; HAYWARD, C.; NADAUD, S.; BALDURSDOTTIR, A.; WALKER, J. J.; LISTON, W. A.; BJARNADOTTIR, R. I.; BROCK, D. J.; GEIRSSON, R. T.; CONNOR, J. M. & SOUBRIER, F. Evidence for a familial pregnancy-induced hypertension locus in the eNOS-gene region. *Am J Hum Genet*, 61(2): 354-362, 1997.

AUGUST, P. & LINDHEIMER, M. D. Pathophysiology of preeclampsia. In: Laragh J. H. & Brenner B. M. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. New York, Raven Press, p. 2427-2450, 1995.

AUGUST, P. & SEALEY, J. E. The renin-angiotensin system in normal and hypertensive pregnancy and in ovarian function. In: Laragh J. H. & Brenner B. M. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. New York, Raven Press, p. 1761-1778, 1995.

AYUK, P. T.; SIBLEY, C. P.; DONNAI, P.; D'SOUZA, S. & GLAZIER, J. D. Development and polarization of cationic amino acid transporters and regulators in the human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278(6): C1162-1171, 2000.

AYUK, PT-Y.; THEOPHANOUS, D.; D'SOUZA, S. W.; SIBLEY, C. P. & GLAZIER, J. D. L-arginine transport by the microvillous plasma membrane of syncytiotrophoblast from human placenta in relation to nitric oxide production: effects of gestation, preeclampsia, and intrauterine growth restriction. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 747-751, 2002.

BAKER, P. N.; DAVIDGE, S. T. & ROBERTS, J. M. Plasma from women with preeclampsia increases endothelial cell nitric oxide production. *Hypertension*, 26(2): 244-248, 1995.

BALLARD, J. L.; KHOURY, J. C.; WEDIG, K.; WANG, L.; EILERS-WALSMAN, B. L. & LIPP, R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr*, 119: 417-423, 1991.

BARRON, W. M. Hipertensão. In: Barron, W. M. & Lindheimer, M. D. *Complicações médicas na gravidez*. Porto Alegre, Artes Médicas, Cap. 1, p.1-27, 1993.

BAYLIS, C.; BEINDER, E.; SÜTÖ, T. & AUGUST, P. Recent insights into the roles of nitric oxide and renin-angiotensin in the pathophysiology of preeclamptic pregnancy. *Semin Nephrol*, 18: 208-230, 1998.

BAYLIS, C. & VALLANCE, P. Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine - what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 7: 59-62, 1998.

BEGUM, S.; YAMASAKI, M. & MOCHIZUKI, M. Urinary levels of nitric oxide metabolites in normal pregnancy and preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*, 22(6): 551-559, 1996.

BLOCK, E. R.; HERRERA, H. & COUCH, M. Hypoxia inhibits L-arginine uptake by pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol*, 269(5): L574-580, 1995.

BOCCARDO, P.; SOREGAROLI, M.; AIELLO, S.; NORIS, M.; DONADELLI, R.; LOJACONO, A. & Benigni, A. Systemic and fetal maternal nitric oxide synthesis em normal pregnancy and preeclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*, 103(9): 879-886, 1996.

BRANCH, D. W. Physiologic adaptations of pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 28(3-4): 120-122, 1992.

BROWN, M. A.; HAGUE, V. M.; HIGGINS, J.; LOWE, S.; MCOWAN, L.; OATES, J.; PEEK, M. J.; ROWAN, A. J. & WALTERS, B. N. J. The detection, investigation and management of hypertension in pregnancy: full consensus statement. Australasian Society for the Study of Hypertension in Pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 40(2): 139-155, 2000.

CALATAYUD, S.; BELTRÁN, B.; BRINES, J.; MONCADA, S. & ESPLUGUES, J. V. Foetal erythrocytes exhibit an increased ability to scavenge for nitric oxide. *Eur J Pharmacol*, 347 (2-3): 363-366, 1998.

CAMPBELL, D. & MAC GILLIVRAY, I. Preeclampsia in second pregnancy. *Br J Obstet Gynecol*, 92: 131, 1985.

CARITIS, S.; SIBAI, B.; HAUTH, J.; LINDHEIMER, M.; VANDORSTEN, P.; KLEBANOFF, M.; THOM, E.; LANDON, M.; RICHARD, P.; MODOVNIK, M.; MEIS, P.; THURNAU, G.; DOMBROWSKI, M.; MCNELLIS, D. & ROBERTS, J. Predictors of pre-eclampsia in women at high risk. *Am J Obstet Gynecol*, 179(4): 946-951, 1998.

CASANELLO, P. & SOBREVIA, L. Intrauterine growth retardation is associated with reduced activity and expression of the cationic amino acid transport systems y⁺/hCAT-1 and y⁺/hCAT-2B and lower activity of nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res*, 91(2): 127-134, 2002.

CASTRO, L. C.; HOBEL, C. J. & GORNBEIN, J. Plasma levels of natriuretic peptide in normal and hypertensive pregnancies: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol*, 171: 1642-1651, 1994.

CHAMBERS, J. C.; FUSI, L.; MALIK, I. S.; HASKARD, D. O.; DE SWIET, M. & KOONER, J. S. Association of maternal endothelial dysfunction with preeclampsia. *JAMA*, 285(12): 1607-1612, 2001.

CHESLEY, L. C. Hypertension in pregnancy: definitions, familial factor, and remote prognosis. *Kidney Int*, 18: 234-240, 1980.

CHESLEY, L. C. Diagnosis of preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 65: 423-425, 1985.

CHRISTENSEN, H. N. & ANTONIOLI, J. A. Cationic amino acid transport in the rabbit reticulocyte. Na⁺-dependent inhibition of Na⁺-independent transport. *J Biol Chem*, 244: 1497-1504, 1969.

CLARK, S. L.; COTTON, D. B.; LEE, W.; BISHOP, C.; HILL, T.; SOUTHWICK, J.; PIVARNIK, J.; SPILLMAN, T.; DEVORE, G. R. & PHELAN, J. Central hemodynamic assessment of normal term pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 161(6): 1439-1442, 1989.

CLOSS, E. I.; SCHELD, J.; MASOUMEH, S. & FÖSTERMANN, U. Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. *Mol Pharmacol*, 57: 68-74, 2000.

CONCEIÇÃO, I. R. S. Transporte eritrocitário da L-arginina nos sistemas y⁺ e y⁺L em gestantes normais e com síndrome de pré-eclâmpsia. Dissertação de Mestrado em Nefrologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil, 2001.

CONRAD, K. P. & COLPOYS, M. C. Evidence against the hypothesis that prostaglandins are the vasodepressor agents of pregnancy. *J Clin Invest*, 77: 236-245, 1986.

CONRAD, K. P.; KERCHNER, L. J. & MOSHER, M. D. Plasma and 24-h NO(x) and cGMP during normal pregnancy and preeclampsia in women on a reduced NO(x) diet. *Am J Physiol*, 277(1 Pt 2): 48-57, 1999.

CUGINI, P.; DI PALMA, L.; BATTISTI, P.; LEONE, G.; PACHI, A.; PAESANO, R.; MASELLA, C.; STIRATI, G.; PIERUCCI, A. & ROCCA, A. R. Describing and interpreting 24-hour blood pressure patterns in physiologic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 166(1): 54-60, 1992.

CUNNINGHAM, F. G.; COX, K. & GANT, N. F. Further observations on the nature of pressor responsivity to angiotensin II in human pregnancy. *Obstet Gynecol*, 46(5): 581-583, 1975.

D'ANIELLO, G.; TOLINO, A. & FISHER, G. Plasma L-arginine is markedly reduced in pregnant women affected by preeclampsia. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 753(2): 427-431, 2001.

DAVEY, D. A. & MACGILLIVRAY, I. The classification and definition of the hypertensive disorders of pregnancy. *Clin Exp Hypertens*, 5(1): 97-133, 1986.

DAVIDGE, S. T.; STRANKO, C. P. & ROBERTS, J. M. Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 174(3): 1008-1013, 1996.

DEKKER, G. A. & SIBAI, B. M. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol*, 179(5): 1359-1375, 1998.

DEKKER, G. A. & SIBAI, B. M. Primary, secondary and tertiary prevention of pre-eclampsia. *Lancet*, 357: 209-215, 2001.

DEVÉS, R. & KRUPKA, R. M. Evidence for a two-state carrier mechanism in erythrocyte transport: effects of substrate analogs on inactivation of the carrier by N-ethylmaleimide. *J Memb Biol*, 61: 21-30, 1981.

DEVÉS, R.; CHAVEZ, P. & BOYD, C. A. R. Identification of a new transport system (γ^+L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J Physiol*, 454: 491-501, 1992.

DEVÉS, R.; ANGELO, S. & CHÁVEZ, P. N-ethylmaleimide discriminates between two lysine transport systems in human erythrocytes. *J Physiol*, 468: 753-766, 1993.

DEVÉS, R. & BOYD, C. A. R. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev*, 78: 487-545, 1998.

DIETL, J. The pathogenesis of pre-eclampsia: new aspects. *J Perinat Med*, 28: 464-471, 2000.

DOMINICZAK, A. F. & BOHR, D. F. Nitric oxide and its putative role in hypertension. *Hypertension*, 25(6): 1202-1211, 1995.

ELLORY, J. C. & YOUNG, J. D. *Red cell membranes a methodological approach*. New York, Academic Press, p. 369, 1982.

ELLORY, J. C. Amino acid transport systems in mammalian red cells. In: Yudilevich, D. L. & Boyd, C. A. R. *Amino acid transport in animal cells*. Manchester, Manchester University Press, Cap. 4, p. 106-119, 1987.

ESPLIN, M. S.; FAUSSET, M. B.; FRASER, A.; KERBER, R.; MINEAU, G.; CARRILLO, J. & VARNER, M. W. Paternal and maternal components of the predisposition of preeclampsia. *N Engl J Med*, 344: 867-872, 2001.

EVANS, W. H. & GRAHAM, J. M. Composition and structure. In: Evans, W. H. & Graham, J. M. *Membrane structure and function*. Oxford, IRL Press, Cap. 2, p.11-30, 1989.

FELDMAN, P. L.; GRIFFITH, O. W. & STUEHR, D. J. The surprising life of nitric oxide. *Chem Eng News*, 20: 26-38, 1993.

FERVENZA, F. C.; HENDRY, B. M. & ELLORY, J. C. Effects of dialysis and transplantation on red cell Na pump function in renal failure. *Nephron*, 53: 121-128, 1989.

FERVENZA, F. C.; MEREDITH, D.; ELLORY, J. C. & HENDRY, B. M. Abnormal erythrocyte choline transport in patients with chronic renal failure. *Clin Sci*, 80: 137-141, 1991.

FORRAY, M. I.; ANGELO, S.; BOYD, C. A. R. & DEVÉS, R. Transport of nitric oxide synthase inhibitors through cationic amino acid carriers in human erythrocytes. *Biochem Pharmacol*, 50(12): 1963-1968, 1995.

FRIEDMAN, S. A.; LUBARSKY, S. L.; AHOKAS, R. A.; NOVA, A. & SIBAI, B. M. Preeclampsia and related disorders. *Clin Perinatol*, 22(2): 343-355, 1995.

FRIEDMAN, S. A. & LINDHEIMER, M. D. Prediction and differential diagnosis. In: Lindheimer, M. D.; Cunningham, F. G. & Roberts, J. M. *Chesley's hypertensive disorders in pregnancy*. Stamford, Appleton & Lange, Cap.6, p. 201-227, 1998.

FURCHGOTT, R. E. & ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-376, 1980.

FURCHGOTT, R. E. & VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*, 3: 2007-2018, 1989.

FURESZ, T. C.; MOE, A. J. & SMITH, C. H. Two cationic amino acid transport systems in human placental basal plasma membranes. *Am J Physiol*, 261(2 Pt 1): C246-C252.

GAIO, D. S.; SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; NUCCI, L. B.; MATOS, M. C. & BRANCHTEIN, L. Hypertensive disorders in pregnancy: frequency and associated factors in a cohort of Brazilian women. *Hypertens Pregnancy*, 20(3): 269-281, 2002.

GALÃO, A. O. Transporte eritrocitário de L-arginina na gestação e período pós-parto. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil, 2000.

GALÃO, A. O.; PINHEIRO DA COSTA, B. E.; D'AVILA, D.; & POLI DE FIGUEIREDO, C. E. L-arginine erythrocyte transport increases during pregnancy and immediately postpartum. *Am J Obstet Gynecol*, 191: 572-575, 2004.

GALLERY, E. D. & BROWN, M. A. Control of sodium excretion in human pregnancy. *Am J Kidney Dis*, 9(4): 290-295, 1987.

GANT, N. F.; CHAND, S.; WHALLEY, P. J. & MACDONALD, P. C. The nature of pressor responsiveness to angiotensin II in human pregnancy. *Obstet Gynecol*, 43(6): 854, 1974.

GARIBOTTO, G.; RUSSO, R.; SOFIA A.; VETTORE, M.; DERTENOIS, L.; ROBAUDO, C. et al. Role of blood cells in leucine kinetics across the human kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283: 1430-1437, 2002.

GIFFORD, R. W.; AUGUST, P. A.; CUNNINGHAM, G.; GREEN, L. A.; LINDHEIMER, M. D. & MCNELLIS, D. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 183: S1-S22, 2000.

GINSBERG, J. M. Use of single voided urine samples to estimate quantitative proteinuria. *New Eng J Med*, 309: 1543-1546, 1983.

GRAHAM, D.; KINGDOM, J. C. P.; MCDONALD, J.; DAVIES, D. L. & KENYON, C. J. Platelet sodium/hydrogen ion exchange in normal pregnancy and non-proteinuric pre-eclampsia. *J Hum Hypertens*, 11: 453-458, 1997.

GRANGER, J. P.; ALEXANDER, B. T.; BENNETT, W. A. & KHALIL, R. A. Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens*, 14(6): 178S-1185S, 2001.

GRIFFITH, T. M.; EDWARDS, D. H.; LEWIS, M. J.; NEWBY, A. C. & HENDERSON, A. H. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature*, 308: 645-647, 1984. (Letter)

GRIFFITH, O. W. & KILBOURN, R. G. Nitric oxide synthase inhibitors: amino acids. *Methods Enzymol*, 268: 375-392, 1996.

HALLIGAN, A.; O'BRIEN, E.; O'MALLEY, K.; MEE, F.; ATKINS, N.; CONROY, R.; WALSH, J. J. & DARLING, M. Twenty-four-hour ambulatory blood pressure measurement in a primigravid population. *J Hypertens*, 11(8): 869-873, 1993.

HAUT, J. C. & CUNNINGHAM, F. G. Preeclampsia-eclampsia. In: Lindheimer, M. D.; Cunningham, F. G. & Roberts, J. M. *Chesley's hypertensive disorders in pregnancy*. Stamford, Appleton & Lange, Cap.5, p. 169-199, 1998.

HAWIGER, J. Platelets in thrombosis and rethrombosis. In: Haber, E. *Scientific American Molecular Cardiovascular Medicine*. New York, Scientific American, Cap. 11, p. 157-175, 1995.

HAYMAN, R.; BROCKELSBY, J.; KENNY, L. & BAKER, P. Preeclampsia: the endothelium, circulating factor(s) and vascular endothelial growth factor. *J Soc Gynecol Invest*, 6(1): 3-10, 1999.

HELEWA, M. E.; BURROWS, R. F.; SMITH, J.; WILLIAMS, K.; BRAIN, P. & RABKIN, S. W. Report of the Canadian Hypertension Society Consensus Conference: 1. definitions, evaluation and classification of hypertensive disorders in pregnancy. *Can Med Assoc J*, 157: 715-725, 1997.

HIBBS, J. B.; TAINTOR R. R. & VAVRIN Z. et al. Synthesis of nitric oxide from a terminal guanosina nitrogen atom of L-arginine: a molecular mechanism regulation cellular proliferation that targets intracellular iron. In: Moncada, S. & Higgs, E. A.; eds. *Nitric Oxide from L-arginine: a bioregulatory system*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B. V., p. 189-223, 1990.

HIGGINS, J. R. & SWIET, M. Blood-pressure measurement and classification in pregnancy. *Lancet*, 357: 131-135, 2001.

HOLDEN, D. P.; FICKLING, S. A.; WHITLEY, G. S. & NUSSEY S. S. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 178(3): 551-556, 1998.

IGNARRO, L. J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 30: 535-560, 1990.

IGNARRO, L. J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol*, 41: 484-490, 1991.

IGNARRO, L. J. Nitric oxide as a communication signal in vascular and neuronal cells. In: Lancaster, J. *Nitric oxide: principles and actions*. New Orleans, Academic Press, Cap.3, p. 111-137, 1996.

- KAIBARA, M.; MARUMOTO, Y. & KOBAYASHI, T. Erythrocyte filterability and fetal development in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 152: 719-720, 1985.
- KAKUDA, D. K.; SWEET, M. J.; MAC LEOD, C. L.; HUME, D. A. & MARKOVICH, D. CAT2-mediated L-arginine transport and nitric oxide production in activated macrophages. *Biochem J*, 340(Pt2): 549-553, 1999.
- KATUSIC, Z. S. & SHEPHERD, J. T. Endothelium-derived vasoactive factors: II. Endothelium-dependent contraction. *Hypertension*, 18(5): 86-92, 1991.
- KINCAID-SMITH, P. S. & FAIRLEY, K. F. Morphological changes in preeclampsia. In: Kincaid-Smith, P. S. & Fairley, K. F. *The kidney and hypertension in pregnancy*. Edinburgh, Churchill Livingstone, p. 25, 1993.
- KLATT, P.; SCHMIDT, K.; WERNER, E. R. & MAYER, B. Determination of nitric oxide synthase cofactors: Heme, FAD, FMN, and Tetrahydrobiopterin. *Methods Enzymol*, 268: 358-365, 1996.
- KULLER, J. A.; D'ANDREA, N. M. & MCMAHON, M. J. Renal biopsy and pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 184: 1093-1096, 2001.
- LANCASTER, J. R. Diffusion of free nitric oxide. *Method Enzymol*, 268: 31-50, 1996.
- LEVINE, R. J.; MAYNARD, S. E.; QIAN, C.; LIM, K.; ENGLAND, L. J.; YU, K. F.; SCHISTERMAN, E. F.; THADHANI, R.; SACHS, B. P.; EPSTEIN, F. H.; SIBAI, B. M.; SUKHATME, V. P. & KARUMANCHI, S. A. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*, 350: 672-83, 2004.
- LEVINE, R. J.; LAM, C.; QIAN, C.; YU, K. F.; MAYNARD, S. E.; SACHS, B. P.; SIBAI, B. M.; EPSTEIN, F. H.; ROMERO, R.; THADHANI, R.; KARUMANCHI, S. A.; CPEP STUDY GROUP. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*, 355(10): 992-1005, 2006.
- LIE, R. T.; RASMUSSEN, S.; BRUNBORG, H.; GJESSING, H. K.; LIE-NIELSEN & IRGENS, L. M. Fetal and maternal contributions to risk of preeclampsia: population based study. *Br Med J*, 316: 1343-1347, 1998.
- LIEB, W. R. A kinetic approach to transport studies. In: Ellory, J. C. & Young, J. D. *Red cell membranes a methodological approach*. New York, Academic Press, Cap. 8, p. 135-164, 1982.

LIEBERMANN, E. Primary Hypertension: pathogenesis. In: Kaplan, N. M. *Clinical Hypertension*. Baltimore, Maryland, Williams & Wilkins, Cap. 3, p. 41-99, 1998.

LINDHEIMER, M. D.; DAVISON, J. M. & KATZ, A. I. The kidney and hypertension in pregnancy: twenty exciting years. *Semin Nephrol*, 21(2): 173-179, 2001.

LORENTZEN, B.; DREVON, C. A.; ENDRESSEN, M. J. & HENRIKSEN, T. Fatty acid pattern of esterified and free fatty acids in sera of women with normal and preeclamptic pregnancy. *Br J Obstet Gynecol*, 102: 530-537, 1995.

LUFT, F. C. Soluble endoglin (sEng) joins the soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt) receptor as a pre-eclampsia molecule. *Nephrol Dial Transplant*, 21(11): 3052-3054, 2006.

LUTZKY, M. Monitorização ambulatorial da pressão arterial em mulheres grávidas nulíparas. Porto Alegre, 1997. 66p. Dissertação de Mestrado em Nefrologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 1997.

LYALL, F.; YOUNG, A. & GREER, I. A. Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 17: 714-718, 1995.

MACGILLIVRAY, I.; ROSE, G. A. & ROWE, B. Blood pressure survey in pregnancy. *Clin Sci*, 37(2): 395-407, 1969.

MALINSKI, T. & TAHA, Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature*, 358: 676-678, 1992.

MARÍN, J. & RODRÍGUES-MARTÍNEZ, M. A. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther*, 75(2): 111-134, 1997.

MCCORD, N.; AYUK, P.; MCMAHON, M.; BOYD, R. C. A.; SARGENT, I. & REDMAN, C. System y^+ arginine transport and NO production in peripheral blood mononuclear cells in pregnancy and preeclampsia. *Hypertension*, 47: 109-115, 2006.

MCDONALD, K. K.; ROUHANI, R.; HANDLOGTEN, M. E.; BLOCK, E. R.; GRIFFITH, O. W.; ALLISON, R. D. & KILBERG, M. S. Inhibition of endothelial cell amino acid transport system y^+ by arginine analogs that inhibit nitric oxide synthase. *Biochim Biophys Acta*, 1342: 133-141, 1997.

MCLAUGHLIN, M. K. & CONRAD, K. P. Nitric oxide biosynthesis during pregnancy: implications for circulatory changes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 22: 164-171, 1995.

MEDAGLIA FILHO, P. V. Dosagem de metabólitos plasmáticos do óxido nítrico no ciclo grávido-puerperal. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil, 2000.

MENDES RIBEIRO, A. C.; ROBERTS, N. B.; LANE, C.; YAQOOB, M. & ELLORY, J. C. Accumulation of the endogenous L-arginine analogue N^G-monomethyl-L-arginine in human end-stage renal failure patients on regular haemodialysis. *Exp Physiol*, 81: 475-481, 1996.

MONCADA, S.; PALMER, R. & HIGGS, A. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension*, 12(4): 365-372, 1988.

MONCADA, S.; PALMER, R. & HIGGS, A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43: 109-142, 1991.

MONCADA, S. & HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, 329(27): 2002-2012, 1993.

MONCADA, S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann NY Acad Sci*, 811: 60-67, 1997.

MORRIS, N.; EATON, B. M. & DEKKER, G. Nitric oxide, the endothelium, pregnancy and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*, 103: 4-15, 1996.

MURAD, F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. *Braz J Med Biol Res*, 32: 1317-1327, 1999.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, 6: 3051-3064, 1992.

NEME, B. Doença hipertensiva específica da gestação: pré-eclâmpsia-eclâmpsia. In: Rezende, J. *Obstetrícia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, Cap. 22, p. 643-690, 1998.

NOBUNAGA, T.; TOKUGAWA, Y.; HASHIMOTO, K.; KIMURA, T.; MATSUZAKI, N.; NITTA, Y.; FUJITA, T.; KIDOGUCHI, K.; AZUMA, C. & SAJI, F. Plasma nitric oxide levels in pregnant patients with preeclampsia and essential hypertension. *Gynecol Obstet Invest*, 41(3): 189-193, 1996.

ODEGARD, R. A.; VATTEN, L. J.; NILSEN, S. T.; SALVESEN, K. A. & AUSTGULEN, R. Risk factors and clinical manifestations of pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*, 107: 1410-1416, 2000.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S. & LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, 87: 315-424, 2007.

PALMER, R. M.; ASHTON, D. S. & MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesis nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333: 664-666, 1988.

PAN, M.; WASA, M.; LIND, S.; GERTLER, J.; ABBOTT, W. & SOUBA, W. W. TNF-stimulated arginine transport by human vascular endothelium requires activation of protein kinase C. *Ann Surg*, 221(5): 590-601, 1995.

PASCOAL, I. & UMANS, J. Effect of pregnancy on mechanisms of relaxation in human omental microvessels. *Hypertension*, 28: 183-187, 1996.

PETTERSSON, A.; HEDNER, T. & MILSOM, I. Increased circulating concentrations of asymmetric dimethyl arginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis, in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 77(8): 808-813, 1998.

PINHEIRO DA COSTA, B. E.; STEIBEL, J.; ANTONELLO, I. C.; GUIMARÃES, J. A. & POLI DE FIGUEIREDO, C. E. L-arginine erythrocyte transport in normal pregnant and preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol*, 190: 468-471, 2004.

PINHEIRO DA COSTA, B. E.; SCOCCO, C.; POLI DE FIGUEIREDO, C. E. & GUIMARÃES, J. A. Increased serum phosphodiesterase activity in women with pre-eclampsia. *BJOG*, 113: 577-579, 2006.

PINTO, A.; SORRENTINO, R.; SORRENTINO, P.; GUERRITONE, T.; MIRANDA, L.; BIONDI, A. & MARTINELLI, P. Endothelial-derived relaxing factor released by endothelial cells of human umbilical vessels and its impairment in pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol*, 164(2): 507-513, 1991.

PIPKIN, F. B. Risk factors for preeclampsia. *N Engl J Med*, 344: 925-926, 2001.

PODJARNY, E.; BEM-CHETRIT, S.; RATHAUS, M.; KORZETS, Z.; GREEN, J.; KATZ, B. & BERNHEIM, J. Pregnancy-induced hypertension in rats with adriamycin nephropathy is associated with an inadequate production of nitric oxide. *Hypertension*, 29: 986-991, 1997.

POLI DE FIGUEIREDO, C. E.; ELLORY, J. C. & HENDRY, B. M. Erythrocyte choline uptake after renal transplantation. *Lancet*, 339: 146-148, 1992.

POLI DE FIGUEIREDO, C. E.; PINHEIRO DA COSTA, B. E.; ANTONELLO, I. C.; VALDES, G. & GERMAIN, A. M. Pregnancy women's stress test. *BMJ*, 326: 845, 2003.

POLLOCK, J.; FÖRSTERMANN, U.; MITCHELL, J. A.; WARNER, T. D.; SCHMIDT, H. H. W.; NAKANE, M. & MURAD, F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 10480-10484, 1991.

POSTON, L. Maternal vascular function in pregnancy. *J Hum Hyp*, 10: 391-394, 1996.

READE, M. C.; CLARK, M. F.; YOUNG, J. D. & BOYD, C. A. Increased cationic amino acid flux through a newly expressed transporter in cells overproducing nitric oxide from patients with septic shock. *Clin Sci*, 102(6): 645-650, 2002.

REDMAN, C. W.; SACKS, G. P. & SARGENT, I. L. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 180: 499-506, 1999.

REDMAN, C. W. & SARGENT, I. L. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta*, 21: 597-602, 2000.

REITZ, A. L. S. Transporte eritrocitário de L-arginina em gestantes normais e com síndrome de pré-eclâmpsia: estudo de transestimulação. Dissertação de Mestrado em Nefrologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2001.

REYES, A.; KARL, I. & KLAHR, S. Role of arginine in health and in renal disease. *Am J Physiol*, 267: F331-346, 1994.

ROBERTS, J. M. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrin*, 16(1): 5-15, 1998.

ROBERTS, J. M. Objective evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia. *Am J Kidney Dis*, 33(5): 992-997, 1999.

ROBERTS, J. M. & COOPER, D. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet*, 357: 53-56, 2001.

ROBERTSON, W. B.; BROSENS, I. & DIXON, G. Uteroplacental vascular pathology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 5: 47-65, 1975.

ROSSELI, M.; KELLER, P. J. & DUBEY, R. K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod*, 4: 3-24, 1998.

ROWLAND, B. L.; VERMILLION, S. T. & ROUDEBUSH, W. E. Elevated circulating concentrations of platelet activating factor in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 183: 930-932, 2000.

SCHNEIDER, F.; LUTUN, P.; BALDAUF, J. J.; QUIRIN, L.; DREYFUS, M.; RITTER, J. & TEMPÉ, J. D. Plasma cyclic GMP concentrations and their relationship with changes of blood pressure levels in pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 75(1): 40-44, 1996.

SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br>>. Acesso em 15 de Janeiro de 2007.

SELLIGMAN, S.; BUYON, J. P.; ROBERT, M. C.; YOUNG, B. K. & ABRAMSON, S. B. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 171(4): 944-948, 1994.

SHEPHERD, J. T. & KATUSIC, Z. S. Endothelium-derived vasoactive factors: I. Endothelium-dependent relaxation. *Hypertension*, 18(5): 76-85, 1991.

SIBAI, B. M.; EWELL, M.; LEVINE, R. J.; KLEBANOFF, M. A.; ESTERLITZ, J.; CATALANO, P. M.; GOLDENBERG, R. L. & JOFFE, G. Risk factors associated with preeclampsia in healthy nulliparous women. *Am J Obstet Gynecol*, 177: 1003-1010, 1997.

SMÁRASON, A. K.; ALLMAN, K. G.; YOUNG, D. & REDMAN, C. W. Elevated levels of serum nitrate, a stable end product of nitric oxide, in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*, 104(5): 538-543, 1997.

SPEAKE, P. F.; GLAZIER, J. D.; AYUK, PT-Y.; READE, M.; SIBLEY C. D. & D'SOUZA, S. W. L-arginine transport across the basal plasma membrane of syncytiotrophoblast of human placenta from normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 4287-4292, 2003.

SPECTOR, N. Manual para a redação de teses, projetos de pesquisa e artigos científicos. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 150, 2001.

- STEIN, W. D. Carrier-mediated transport: facilitated diffusion. In: Stein, W. D. *Channels, carriers, and pumps. An introduction to membrane transport*. London, Academic Press, Cap. 4, p. 127-171, 1990.
- STELLA, A. & GRELLA, P. Automated blood pressure monitoring in normal pregnancy. *Int J Gynecol Obstet*, 55: 11-17, 1996.
- STEWART, G. W. & FRICKE, B. The curious genomic path from leaky red cell to nephritic kidney. *Nephron Physiol*, 93: 29-33, 2003.
- STREVENS, H.; WIDE-SWENSSON, D.; HANSEN, A.; HORN, T.; INGEMARSSON, I.; LARSEN, S.; WILLNER, J. & OLSEN, S. Glomerular endotheliosis in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*, 110: 831-836, 2003.
- STRYER, L. Enzimas: conceitos básicos e cinética. In: Stryer, L. *Bioquímica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, Cap. 8, p. 171-184, 1996.
- SUTHERLAND, A.; COOPER, D. W.; HOWIE, P. W.; LISTON, W. A. & MACGILLIVRAY, I. The incidence of severe pre-eclampsia amongst mothers and mothers-in-law of pre-eclamptics and controls. *Brit J Obstet Gynaec*, 88(8): 785-791, 1981.
- VISSER, W. & WALTENBURG, H. C. S. Central hemodynamic observations in untreated pre-eclamptic patients. *Hypertension*, 17: 1072, 1991.
- WALKER, J. J. Pre-eclampsia. *Lancet*, 356: 1260-1265, 2000.
- WILLIAMS, D. Pregnancy: a stress test for life. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 15(6): 465-71, 2003.
- WORLEY, R. J.; HENTSCHEL, W. M.; CORMIER, C.; NUTTING, S.; PEAD, G.; ZELONKOV, K.; SMITH, J. B.; ASH, K. O. & WILLIAMS, R. R. Increased sodium-lithium countertransport in erythrocytes of pregnant women. *N Engl J Med*, 307: 412-416, 1982.
- WU, G. & MORRIS, S. M. Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*, 336 (Pt 1): 1-17, 1998.
- YOUNG, J. D. & ELLORY, J. C. Red cell amino acid transport. In: Ellory, J. C. & Young, J. D. *Membrane transport in red cells*. New York, Academic Press, p. 301-325, 1977.

YOUNG, J. D. & ELLORY, J. C. Flux measurement. In: Ellory, J. C. & Young, J. D. *Red cell membranes a methodological approach*. New York, Academic Press, Cap. 7, p. 119-134, 1982.

YOUNG, J. D. & ELLORY, J. C. A Kinetic Approach to Transport Studies. In: Ellory, J. C. & Young, J. D. *Red cell membranes a methodological approach*. London, Academic Press-London LTD, Cap. 8, p. 135-164, 1982.

YUDILEVICH, D. L. & BOYD, C. A. R. Introduction. In: Yudilevich, D. L. & Boyd, C. A. R. *Amino acid transport in animal cells*. Oxford, Manchester University Press, p. 1-9, 1987.

ANEXO 1

Artigo submetido para revista *Hypertension*.

L-ARGININE UPTAKE IN PREECLAMPSIA AND NORMAL PREGNANCY: SYSTEMS y^+ AND y^+L

Ioná Rosine Scolari Conceição, Bartira Ercília Pinheiro da Costa, Anie Letícia Schmitz Reitz, Carlos Eduardo Poli de Figueiredo

Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde (Nefrologia), Instituto de Pesquisas Biomédicas/Faculdade de Medicina/Hospital São Lucas Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av Ipiranga 6690, CEP 90610.000, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

No reprints requested

Carlos Eduardo Poli de Figueiredo

Centro Clínico PUCRS Conj. 414, Av. Ipiranga, 6690.

Porto Alegre, RS, Brazil

CEP 90610-000

Phone: ++ 55 51 3367700

Fax: ++ 55 51 3203312

E-mail: cepolif@pucrs.br

Short head line: L-arginine uptake and preeclampsia.

ABSTRACT

Objective: to evaluate two erythrocyte L-arginine transport systems y^+ and y^+L in preeclampsia and normal pregnancy.

Methods: Preeclampsia was defined as hypertension, and proteinuria above 300mg/24h in pregnant women after the 20th gestational week. Patients were divided into two groups: normal pregnancy (n:24) and preeclampsia (n:25). Maximal capacity of transport (V_{max} in $\mu\text{mol/L cell/h}$) and half-saturation constant (k_m in $\mu\text{mol/L}$) were measured in erythrocytes using ^{14}C as marker, and N-ethyl-maleimide used as inhibitor of y^+ system.

Results: System y^+ V_{max} was 1462 ± 395 $\mu\text{mol/L cell/h}$ and 1291 ± 486 (NS), and k_m was 75 ± 18 $\mu\text{mol/L}$ and 62 ± 16 (p 0.007) for preeclampsia and normal pregnancy, respectively. The V_{max} for system y^+L was 342 ± 191 $\mu\text{mol/L cell/h}$ and 236 ± 70 (p 0.015), and k_m was 40 ± 21 $\mu\text{mol/L}$ and 24 ± 13 (p 0.003) for preeclampsia and normal pregnancy, respectively.

Conclusion: Abnormal L-arginine transport was present in preeclampsia. Transporter affinity for L-arginine was reduced for both systems and y^+L V_{max} increased in preeclampsia.

Key words: Hypertension; Pregnancy toxemias; Nitric oxide; Membrane Transport Proteins, Blood pressure

Preeclampsia is a hypertensive disorder of human pregnancy associated with increased urinary protein excretion in women after the 20th week of pregnancy. It is a major cause of maternal and perinatal mortality and morbidity. Hypertensive disorders occurs in 6 to 8% of pregnancies (Gifford *et al*, 2000). The cause of preeclampsia remains unknown. This syndrome is characterized by vasoconstriction, activation of the coagulation system and reduced uteroplacental perfusion. The main pathologic changes are primary ischemic and affects several organs, and endothelial dysfunction has been suggested. The increased peripheral vascular resistance seems to be due to enhanced responsiveness to the action of vasopressor agents, and reduced action of vasodilator systems. Alterations in the L-arginine-nitric oxide pathway have been suggested (Baylis *et al*, 1998, Morris *et al*, 1996).

Nitric oxide, synthesized from the aminoacid L-arginine, is a potent vasodilator and involved in platelet aggregation (Moncada & Higgs, 1993). Production of nitric oxide depends on the intracellular presence of its precursor. We have previously shown increased erythrocyte total L-arginine maximal capacity of uptake in patients with preeclampsia syndrome in comparison to normal pregnant women (Pinheiro da Costa *et al*, 2004). L-arginine enters the erythrocyte via cationic aminoacid transporters systems, such as y^+ and y^+L systems (Devés & Boyd, 1998).

The aim of the present study was to evaluate two erythrocyte L-arginine transport systems, y^+ and y^+L , in separate, in preeclampsia and to compare with normal pregnancy.

PATIENTS AND METHODS

Participants

The study protocol was approved by the Scientific and Ethics Committees of the Medical School and São Lucas Hospital of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. All patients were clarified of the research aims, risks and benefits and were included only after informed consent was given.

Preeclampsia was defined as suggested by the National High Blood Pressure Education Program Working Group (Gifford *et al*, 2000). Twenty-five women with preeclampsia and 24 normal pregnant women (gestational age > 20 weeks) were included. Hypertension was considered when systolic blood pressure exceeded 140 mmHg and diastolic blood pressure 90 mmHg after the 20th week of pregnancy in a previously normotensive woman, associated with proteinuria exceeding 300 mg/24 hours. Normal pregnancy was considered in pregnant women who never developed preeclampsia during pregnancy, and had no past history diseases such as high blood pressure, renal, cardiovascular, thyroid and diabetes. Normal pregnant women had also normal urine sediment and a normal fundii. Proteinuria was measured by acid precipitation with turbidimetric read, in a 24-hour urine sample or in random urine and the proteinuria/creatininuria ratio was used to estimate 24-hour protein excretion. Results were reported in mg/24 hours. Patients with signs of previous hypertensive retinopathy were excluded.

Preeclampsia and controls were selected from patients attending to the obstetric department at São Lucas Hospital – PUCRS, a University Hospital in Southern Brazil. The gestational age was defined according to a reliable date of the last menstrual period or by early (<12 weeks) ultrasound evaluation.

Erythrocyte L-arginine uptake

Blood collected in heparinized tubes was centrifuged and washed three times with ice-cold saline solution (platelets/white cell layer discarded) for separation of erythrocytes. All samples were kept in ice until uptake assays were performed. Erythrocytes were separated into two aliquots, one was incubated with N-ethyl maleimide (NEM) prior to uptake measurements.

Total erythrocyte L-arginine uptake was determined by incubating cells for three minutes at 37°C (pH 7.4) in a water bath with progressive L-arginine concentrations (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 180, 200, 300, and 500 $\mu\text{mol/L}$) and ^{14}C as a marker. Uptake was interrupted by transferring the sample tubes into ice. Erythrocytes were then washed free of extracellular radioactivity, lysed (triton 0,1% v/v), and protein-precipitated (trichloroacetic acid 5% w/v) to recover their intracellular content, followed by radioactivity counting in a liquid-scintillation counter. Uptake was corrected to $\mu\text{mol/L cells/h}$. Maximal transport capacity (V_{max} in $\mu\text{mol/L cells/h}$) and half-saturation (k_m in $\mu\text{mol/L}$) were derived from Michaelis-Menten kinetics, using a computer software (Enzfitter for MS-DOS). All L-arginine uptake assays were performed in duplicate. NEM, 0.8 mM, was used to measure the NEM-insensitive fluxes – corresponding to the activity of the $y^+\text{L}$ system. The NEM-sensitive uptake was considered as the uptake via the y^+ system.

Statistics

Mean, standard deviation were calculated for all variables. Student's t test and chi-square (χ^2) were employed. A $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. The Statistical Package for the Social Sciences was used for all analyses.

RESULTS

Twenty-five patients with preeclampsia syndrome and 24 normal pregnancies were studied. Clinical characteristics of the study and control groups are shown in Table 1. Clinical variables that characterize preeclampsia were significantly different when the two groups were compared.

Michaelis-Menten kinetics of L-arginine uptake via y^+ and y^+L systems are shown in Table 2. The maximal capacity of L-arginine uptake (V_{max}) through y^+L system was significantly increased in preeclampsia when compared with normal pregnant women. The half-saturation constant (k_m) for both systems, y^+ and y^+L , was increased in preeclampsia. No significant difference in $y^+ V_{max}$ was detected.

DISCUSSION

The present study shows that transport kinetics of the erythrocyte L-arginine transport is altered in preeclampsia. Increased half-saturation constant – k_m – for both L-arginine transporters, y^+ and y^+L was disclosed. Maximal capacity of transport of the nitric oxide precursor, L-arginine, via y^+L system was enhanced in preeclampsia. It contributes to elucidate the mechanisms of the altered total erythrocyte L-arginine transport in patients with preeclampsia syndrome that we have previously reported (Pinheiro da Costa *et al*, 2004). The system involved in the higher capacity of transport seems to be the y^+L , a transporter with higher affinity and lower capacity of transport in comparison to y^+ (Devés & Boyd, 1998).

Preeclampsia syndrome is characterized by altered vascular responsiveness to pressor agents, resulting in increased vasoconstriction and high blood pressure (Gifford *et al*, 2000; Baylis *et al*, 1998; Morris *et al*, 1996). The L-arginine metabolism

via the L-arginine-nitric oxide pathway is important in blood pressure control and vascular relaxation (Moncada & Higgs, 1993). It is possible that abnormal L-arginine transport may have an impact on nitric oxide synthesis and participate in the etiology or pathophysiology of preeclampsia.

Plasma and intracellular L-arginine concentration, and the levels of its analogs, were not measured, but the increased L-arginine transport V_{max} indicates increased uptake of the nitric oxide precursor. L-arginine is a non-essential amino acid, but it behaves as an essential one in conditions of stress and injury such as trauma, growth and sepsis (Barbul, 1986). We have no data on the behavior of L-arginine in preeclampsia to suggest that it may be an essential amino acid, but it has been reported a beneficial effect of L-arginine administration in preeclampsia (Fachinetti *et al*, 1999). It is interesting that the system with increased activity is the y^+L , the high affinity system (Devés & Boyd, 1998). Normotensive pregnant women have a lower plasma L-arginine concentration than 3 days and 3 months postpartum (Pettersson *et al*, 1998), and the same happens to preeclamptic women.

Increased V_{max} be the result of trans-stimulation, the acceleration of transporter activity by L-arginine, or other compatible substrates for the L-arginine transporters (Devés & Boyd, 1998). Endogenous analogs of L-arginine, such as asymmetric dimethyl arginine (ADMA), are increased in preeclampsia (Pettersson *et al*, 1998), and they also have affinity for L-arginine transporters (Devés & Boyd, 1998). These analogs are inhibitors of the nitric oxide synthases and would induce reduction in nitric oxide production (Devés & Boyd, 1998), despite increased L-arginine uptake. The combination of low plasma L-arginine levels and elevated ADMA concentration during the late phase of pregnancy complicated by preeclampsia led to the suggestion of a role of endogenous nitric oxide synthases inhibitors in the pathogenesis of preeclampsia (Pettersson *et al*,

1998), and our paper questions if one possible mechanism might be via altered L-arginine transporters.

It is possible that under this pathological setting the y⁺L system enhances its activity. Increased number of transport sites in the membrane or an increase in the turnover rate per transport site could both result in increased maximal capacity of transport. Altered half-saturation constant indicates that affinity for L-arginine is reduced in preeclampsia. The overall effects may reflect that there maybe an intrinsic alteration in the membrane properties, and not only altered substrate concentrations. Preeclampsia may be associated with cell membrane adaptations resulting in transporter changes that would induce altered aminoacid transport kinetics.

Other diseases, such as renal failure and heart failure, also have altered membrane permeability to L-arginine (Mendes Ribeiro *et al*, 1997; Kaye *et al*, 2000). L-arginine transporters are also present in other cells types, like endothelial, leukocytes, platelets, placental cells and others (Devés & Boyd, 1998). Those cells and tissues are important in preeclampsia, considering the role of the placenta and endothelial dysfunction in preeclampsia. It will be interesting to investigate the kinetics of transport in these cells. It has been shown that L-arginine transport is regulated by factors such as protein kinase C and tumor necrosis factor (Haller *et al*, 1998; Pan *et al*, 1995). Haller *et al*. (Haller *et al*, 1998), using endothelial cells, have suggested that serum from preeclamptic patients may contain factors that increase cell permeability.

In conclusion, it is shown that L-arginine transport is altered in preeclampsia and it is suggested that it may play a role in the pathogenesis of the preeclampsia syndrome. The clinical relevance of these findings are still not clear.

CONTRIBUTORS

Poli de Figueiredo and Costa initiated the idea. Conceição is a M.Sc. Student and performed the L-arginine uptake assays. All the authors planned the study and contributed to data analysis and to the final report.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Nephrology Laboratory is supported by PUCRS, Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul (SCT), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and by the Internal Medicine Department - Nephrology Division.

REFERENCES

Ayuk PT-Y, Theophanous D, D'Souza SW, Sibley CP, Glazier JD. L-arginine transport by the microvillous plasma membrane of syncytiotrophoblast from human placenta in relation to nitric oxide production: effects of gestation, preeclampsia, and intrauterine growth restriction. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:747-51.

Barbul A. Arginine: biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *J Parenter Enteral Nutr* 1986; 10(2):227-238.

Bayes Garcia R, Maldonado Lozano J, Narbona Lopez E, Gil A, Faus MJ. Branched-chain amino acids: indicators of fetal nutritional status. *An Esp Pediatr* 1986; 25(4):240-6.

Baylis C, Beinder E, Sütö T, August P. Recent insights into the roles of nitric oxide and renin-angiotensin in the pathophysiology of preeclamptic pregnancy. *Semin Nephrol* 1998;18(2):208-30.

Boucher JL, Moali C, Tenu JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55(8-9):1015-28.

Calatayud S, Beltrán B, Brines J, Moncada S, Esplugues JV. Foetal erythrocytes exhibit an increased ability to scavenge for nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 1998; 347:363-6.

Carbillon L, Uzan M, Uzan S. Pregnancy, vascular tone, and maternal hemodynamics: a crucial adaptation. *Obstet Gynecol Surv* 2000;(9):574-81.

Cetin I. Placental transport of amino acids in normal and growth-restricted pregnancies *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 110: s50-4.

Devés R, Boyd R. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure and function. *Physiol Rev* 1998;78(2):487-545.

Fachinetti F, Longo M, Piccinini F, Neri I, Volpe A. L-arginine infusion reduces blood pressure in preeclamptic women through nitric oxide release. *J Soc Gynecol Invest* 1999;6:202-7.

Fickling SA, Williams D, Vallance P, Nussey SS, Whitley GS. Plasma concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Lancet* 1993; 24;342(8865):242-3.

Garibotto G, Russo R, Sofia A, Vettore M, Dertenois L, Robaudo C et al. Role of blood cells in leucine kinetics across the human kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: F1430-7.

Gifford RW, August PA, Cunningham G, Grenn, LA, Lindheimer MD, Mcnellis D. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:S1-S22.

Haller H, Hempel A, Homut V, Mandelkow A, Busjahn A, Maasch C, et al. Endothelial-cell permeability and protein kinase C in pre-eclampsia. *Lancet* 1998; 351:945-9.

Kaibara M, Marumoto Y, Kobayashi T. Erythrocyte filterability and fetal development in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 152(6):719-20.

Kaye DM, Ahlers BA, Autelitano DJ, Chin-Dusting JPF. In vivo and in vitro evidence for impaired arginine transport in human heart failure. *Circulation* 2000; 102:2707-12.

McDonald KK, Rouhani R, Handlogten ME, Block ER, Griffith OW, Allison RD, Kilberg MS. Inhibition of endothelial cell amino acid transport System y⁺ by arginine analogs that inhibit nitric oxide synthase. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1324:133-41.

McDonald KK, Zharikov S, Block ER, Kilberg MS. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J Biol Chem* 1997 Dec 12; 272(50):31213-6.

Mendes Ribeiro AC, Hanssen H, Kiessling K, Roberts NB, Mann GE, Ellory JC. Transport of L-arginine and the nitric oxide inhibitor NG-monomethyl-L-arginine in human erythrocytes in chronic renal failure. *Clin Sci (Colch)* 1997; 93:57-64.

Moncada S, Palmer MJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-42.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329:2002-12.

Morris NH, Eaton BM, Dekker G. Nitric oxide, the endothelium, pregnancy and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103(2):4-15.

Nobunaga T, Tokugawa Y, Hashimoto K, Kimura T, Matsuzaki N, Nitta Y et al. Plasma nitric oxide levels in pregnant patients with preeclampsia and essential hypertension. *Gynecol Obstet Invest* 1996; 41(3):189-93.

Pan M, Wasa M, Lind DS, Gertler J, Abbott W, Souba WW. TNF-stimulated arginine transport by human vascular endothelium requires activation of protein kinase C. *Ann Surg* 1995; 221(5):590-601.

Pawloski JR, Hess DT, Stamler JS. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature* 2001; 409:622-6.

Pettersson A, Hedner T, Milson I. Increased circulating concentrations of asymmetric dimethyl arginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis, in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 77:808-13.

Pinheiro 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.

Remesar X, Arola L, Palou A, Alemany M. Arginase activity during pregnancy and lactation. *Horm Metab Res* 1984; 16(9):468-70.

Selligman S, Buyon J, Clancy R, Young B, Abramson S. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171(4):944-8.

Speake PF, Glazier JD, Ayuk PT-Y, Reade M, Sibley CP, D'Souza SW. L-arginine transport across the basal plasma membrane of syncytiotrophoblast of human placenta from normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4287-92.

Stewart GW, Fricke B. The curious genomic path from leaky red cell to nephrotic kidney. *Nephron Physiol* 2003; 93:29-33.

Tsikas D, Boger RH, Sandmann J, Bode-Boger SM, Frolich JC. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Lett* 2000; 478(1-2):1-3

Table 1. Demographic information of normal and preeclamptic patients

Variable	Preeclampsia (n:25)	Controls (n:24)	p
Age (years)	29 ± 9	29 ± 6	0.924 (t*)
Gestational age (weeks)	33.4 ± 4	33.2 ± 4	0.831 (t*)
White color (f / %)	22 / 88	16 / 67	0.074 (χ ² †)
Proteinuria (mg/24 hours)	3330 ± 370	155 ± 10	<0.0001(t*)
Systolic blood pressure mmHg)	146 ± 15	103 ± 10	<0.0001(t*)
Diastolic blood pressure (mmHg)	94 ± 8	66 ± 7	<0.0001(t*)
Serum uric acid (mg/dL)	6 ± 2	4 ± 1	0.003 (t*)
Serum creatinine (mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.022 (t*)

*t = Student's t test; †χ²= chi-square.

Table 2. Erythrocyte L-arginine uptake information of normal and preeclamptic patients.

Transporter	L-arginine uptake†	Preeclampsia (n:25)	Controls (n:24)	p (t*)
Y ⁺	V _{max} (μmol/L cells/h)	1461 ± 394	1291 ± 486	0.075
	k _m (μmol/L)	75 ± 19	62 ± 16	0.007
Y ^{+L}	V _{max} (μmol/L cells/h)	432 ± 191	236 ± 70	0.015
	k _m (μmol/L)	40 ± 22	24 ± 13	0.003

*t= Student's t test., † V_{max}= maximal capacity of transport and k_m= half-saturation constant.

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
LINHA DE PESQUISA EM NEFROLOGIA:
ENFOQUE NA GESTAÇÃO E PRESSÃO ARTERIAL

Pesquisadores Responsáveis: Bartira Ercília Pinheiro da Costa, Carlos Eduardo Poli de Figueiredo, Domingos Otávio L. d'Ávila, Ivan Carlos Ferreira Antonello, João Píffero Steibel.

Entrevistador da Equipe de Pesquisa: _____

Nome da paciente: _____

SOBRE A PESQUISA: A presente linha de pesquisa avalia aspectos da gravidez, como pressão sanguínea e pressão alta na busca do aumento do conhecimento, alívio do sofrimento e melhora da saúde de mulheres e crianças. Esta Linha de Pesquisa é parte do Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina e do Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

Nos estudos serão avaliados diversos aspectos que podem influenciar na doença, tais como: marcadores presentes no sangue, na urina, na placenta ou em tecidos; função dos vasos sanguíneos; função das células; função de órgãos, como os rins; sensibilidade gustativa ao sal; e fatores genéticos.

A idéia é estudar fatores que possam ser importantes para a ocorrência da doença pré-eclâmpsia, que é a elevação da pressão arterial na gestação com perda de proteína na urina. Estes testes poderão ajudar a diagnosticar as pessoas em risco ou com esta condição, ou eventualmente auxiliar na formulação de novos tratamentos.

O QUE SERÁ FEITO: Você será convidada para uma entrevista com um dos membros da equipe de pesquisa. O pesquisador lhe dirá de que se trata a linha de pesquisa e o estudo que está sendo oferecido. Então será perguntado se deseja participar da pesquisa.

Caso concorde, após assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, serão perguntados dados de sua história médica, coletado um volume de sangue venoso e/ou urina antes e depois do parto, além das coletas dos exames de rotina. Alguns dos estudos desta linha de pesquisa avaliam outros aspectos e também poderá ser coletado amostra de sangue do cordão umbilical após o parto e amostra da placenta, e/ou avaliação da função dos vasos por ecografia, e/ou medida da sensibilidade gustativa ao sal. Em alguns estudos, são avaliados a presença de marcadores genéticos. Os genes a serem estudados são extraídos do sangue ou da placenta, tentando identificar especificamente os possíveis causadores desta doença. Após o parto você poderá ser convidada a realizar acompanhamento clínico com o grupo no ambulatório Nefrologia. Este grupo atende e acompanha pacientes com hipertensão arterial sistêmica e doença hipertensiva da gestação (entre elas pré-eclâmpsia). As mulheres que desenvolvem complicação durante a gestação, têm um maior risco de doenças vasculares no futuro. A idéia do grupo é de acompanhar estas mulheres, a longo prazo, com a finalidade de observar a evolução, detectar fatores de risco ou sinais de doença, encaminhando a prevenção e/ou tratamento destes. Meses após o parto, poderá ser solicitado um exame de cintilografia renal que visa detectar a presença de cicatrizes no rim de mulheres em risco (cicatrizes são mais comuns em mulheres que desenvolveram hipertensão na gestação). Estas avaliações não interferirão nas suas avaliações e cuidados rotineiros.

O material biológico da pesquisa será coletado e congelado até a análise pelos colaboradores do Laboratório de Nefrologia da PUCRS. Os resultados serão publicados em revistas de circulação no meio médico e em congressos.

Para que os estudos possam ser realizados, é necessário que você faça a opção autorizando ou não a coleta dos diferentes materiais ou realização dos exames:

Acompanhamento ambulatorial: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Urina: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Placenta: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Sangue: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Sangue do Cordão Umbilical: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Ecografia dos vasos: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Análise genética: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Cintilografia renal: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Sensibilidade Gustativa ao Sal: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

*OBS.: Nem todos os testes acima serão necessariamente realizados.

CONFIDENCIALIDADE: Os registros serão mantidos em segredo. O material poderá ser utilizado apenas para esta pesquisa, ou também ser armazenado para emprego em futuros estudos. É necessário que você faça a opção autorizando ou não o armazenamento para emprego futuro: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Se houver possibilidade de fazermos novas análises com o material coletado, será novamente solicitada a aprovação das Comissões de Ética em Pesquisa para realizar a avaliação adicional. Os estudos são desenvolvidos de forma anônima. Os resultados da pesquisa estarão disponíveis a você em qualquer momento por qualquer motivo. Questionamos se você gostaria de ser comunicada sobre o resultado do estudo. É necessário que você faça a opção escrevendo SIM ou NÃO: _____ QUERO SABER DO RESULTADO DA PESQUISA.

RISCOS E BENEFÍCIOS: Os riscos ou desconfortos dessa pesquisa são considerados mínimos ou até nulos. Este estudo não lhe trará nenhum tipo de discriminação individual ou coletiva. A presente pesquisa se propõe a colaborar com o conhecimento sobre a gestação e suas doenças relacionadas com o controle da pressão arterial, não trazendo benefícios diretos para as pacientes participantes.

LIBERDADE: A sua participação na pesquisa é totalmente voluntária e você pode desistir a qualquer momento, sem prejuízo do tratamento e sem a necessidade de explicar o motivo.

Eu, _____ fui informada pelo(a) _____ dos objetivos e justificativas dessa pesquisa de forma bem clara e detalhada. Recebi informações sobre cada passo que estarei envolvida. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza, e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Estou ciente que as informações por mim fornecidas serão mantidas em segredo e usadas somente conforme opção acima. Fui informada que se existirem danos a minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização, conforme estabelece a lei. Também sei que não terei nenhum custo que seja relacionado a pesquisa.

Caso tiver novas perguntas sobre este trabalho, posso chamar os pesquisadores pelos seguintes telefones (051) 33367700, 33369599, ou 33203000 - Ramais 3174 ou 2344, para qualquer dúvida como participante deste estudo.

Esta pesquisa tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS. Sob as condições acima mencionadas, concordo em participar do presente estudo. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovando-o e assinando-o após lê-lo com todo o cuidado possível.

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.

Paciente ou Responsável
CI

Investigador
CI/CRM

***EQUIPE PARTICIPANTE:** Alexandra Tonel Schröder, André Poisl Fay, Bartira Ercília Pinheiro da Costa, Carlos Eduardo Poli de Figueiredo, Domingos Otávio L. d'Avila, Fabiane Palma Bisinela, Giovana Maffazioli, Giovani Gadonski, Iara dos Santos Fagundes, Ioná Conceição, Ivan Carlos Ferreira Antonello, João Piffero Steibel, Jorge Milton Neumann, Kiele Hoffmann, Mateus Alexandretti, Priscilla Barcelos Almeida.

ANEXO 3

PROTOCOLO: Transporte Eritrocitário da L-arginina de GN e com SPE**DENTIFICAÇÃO:**

NOME: _____
 PROTOCOLO: _____ REGISTRO HSL: _____ FONE: _____
 ENDEREÇO: _____ CIDADE: _____
 RAÇA: branca mista negra DN: ___/___/___ IDADE: _____

ANAMNESE:

DUM: _____ Certeza: sim não IG: _____ (DUM) _____ (ECO)
 G ___ P ___ A ___ → Provocados Espontâneos

HISTÓRIA MÉDICA PREGRESSA:

INFECÇÃO URINÁRIA: Se sim → infância idade adulta
 HAS → Se sim → Idade ou IG no diagnóstico: _____ PE prévia DM
 DROGAS: _____

HISTÓRIA FAMILIAR: HAS: não sim parentesco: _____

EXAME FÍSICO: DATA: _____ IG (sem): _____
 PAS (mmHg): _____ PAD (mmHg): _____ ALT (cm): _____ PESO (Kg): _____

EXAMES LABORATORIAIS: DATA: _____ G (sem): _____
 EQU: pH: ___/dens: ___/prot. ___+/ hem ___+ /leuc. ___/ hem ___/ cél ___ p/c
 HCT (%): _____ HB (g/dL): _____ PLAQUETAS: _____
 ÁCIDO ÚRICO (mg/dL): _____ CREATININA (mg/100mL): _____ GLICEMIA JEJUM (mg/dL): _____
 *PROTEINÚRIADE/AMOSTRA(mg/dL): ___ *CREATININÚRIA/AMOSTRA(mg/dL): ___ *P/C: ___
 *PROTEINÚRIA DE 24h (mg/24h): _____ * **NÃO PRECISA PARA GN!**
 OUTROS: _____

DADOS DO PARTO: DIA _____ HORA _____
 TIPO DE PARTO: Normal Cesáreo por _____

DADOS DO RECÉM-NASCIDO: SEXO: F M APGAR ___/___ IG _____ IGP: _____
 PESO DO RN: _____g PESO PLACENTA: _____g AIG GIG PIG

CLASSIFICAÇÃO: PE PE superposta GN HG HC

DATA: _____ RESPONSÁVEL: _____

PROTOCOLO: Transporte Eritrocitário da L-arginina em Mulheres Normais e Portadoras de HAS

IDENTIFICAÇÃO:

NOME: _____
 PROTOCOLO: _____ REGISTRO HSL: _____ FONE: _____
 ENDEREÇO: _____
 RAÇA: branca mista negra DN: ___/___/___ IDADE: _____

HISTÓRIA MÉDICA:

INFECÇÃO URINÁRIA: Se sim → infância idade adulta

HAS Se sim → Idade do diagnóstico: _____

DROGAS: _____

PE prévia DM

G ___ P ___ A ___ → Provocados Espontâneos

HISTÓRIA FAMILIAR: HAS: não sim → parentesco: _____

EXAME FÍSICO: DATA: _____

PAS (mmHg): _____ PAD (mmHg): _____ ALT (cm): _____ PESO (Kg): _____

EXAMES LABORATORIAIS: DATA: _____ **G (sem):** _____

EQU: pH: ___/dens: ___/prot. ___+/ hem ___+ /leuc. ___/ hem ___/ cél ___ p/c

HCT (%): _____ HB (g/dL): _____ PLAQUETAS: _____

ÁCIDO ÚRICO (mg/dL): _____ CREATININA (mg/100mL): _____ GLICEMIA JEJUM (mg/dL): _____

*PROTEINÚRIADE/AMOSTRA(mg/dL): ___ *CREATININÚRIA/AMOSTRA(mg/dL): ___ *P/C: ___

*PROTEINÚRIA DE 24h (mg/24h): _____ * **NÃO PRECISA PARA MULHERES NORMAIS!**

OUTROS: _____

CLASSIFICAÇÃO: HAS Mulher normal

DATA: _____

RESPONSÁVEL: _____

ANEXO 4

Artigo submetido ao *The Journal of Membrane Biology*

L-ARGININE γ^+ TRANSPORTER INHIBITION BY *N*-ETHYLMALEIMIDE IN ICE-BATH

Ioná Rosine Scolari Conceição, Priscilla Barcellos Almeida, Bartira Ercília Pinheiro da Costa, Carlos Eduardo Poli de Figueiredo.

SUMMARY

Erythrocytes L-arginine uptake occurs via γ^+ and γ^+L systems. Pre-incubation with *N*-ethylmaleimide is usually performed for 10 minutes at 37°C inhibits γ^+ . Our aim was to verify the ideal temperature for erythrocytes pre-incubation with the inhibitor, to evaluate the γ^+ and γ^+L systems. Cells were pre-incubated with and without *N*-ethylmaleimide at 4°C and 37°C for 10 minutes. L-arginine uptake was measured using radioisotope and established membrane flux methodology. The results indicate that pre-incubation at 37°C for 10 minutes depletes cells of their L-arginine content, altering the measurements of the V_{max} . The inhibitory effect of *N*-ethylmaleimide was temperature and time independent. No significant difference between kinetic parameters was detected for cells pre-incubated either at 37°C or 4°C, under zero-trans conditions. We suggest that measurement of γ^+ and γ^+L system by the L-arginine uptake can be in a single step experiment, avoiding pre-incubation at 37°C with *N*-ethylmaleimide.

Key words – membrane transporters, nitric oxide, cationic amino acid transporters, carrier, erythrocytes.

INTRODUCTION

Amino acid transport across plasma membrane is mediated by a variety of carriers (Palacín *et al*, 1998). Alterations of carrier-mediated transport have been described in pregnancy (Furesz, Moe & Smith, 1991) and in pathologies (Déves & Boyd, 1998), like uremia (Ferverza *et al*, 1990; Poli de Figueiredo, Ellory & Hendry, 1992; Welt, Sachs & McManus, 1964), hypertension (Valle *et al*, 2001), pregnancy-induced hypertension (Rubython & Morgan, 1983; Speake *et al*, 2003; Pinheiro da Costa *et al* 2004) and inherited diseases (Palacín *et al*, 1998).

The regulation of blood pressure involves the L-arginine-nitric oxide pathway (Moncada, Palmer & Higgs, 1991). This metabolic via includes L-arginine as a unique precursor of nitric oxide, a potent endothelium-derived relaxing factor (Palmer, Ashton & Moncada, 1988). L-arginine influx into cells occurs through two cationic amino acids transporters: the classical system γ^+ (Christensen & Antonioli, 1969) and a recently described high affinity system γ^+L (Devés, Chavez, & Boyd, 1992). These transporters exhibit affinity to others amino acids such as lysine, ornithine and arginine analogs (Boyd & Crawford, 1992; Christensen, 1990; Déves *et al*, 1992). Levels of endogenous L-arginine analogs are altered in some pathological states, resulting in decreased nitric oxide production due to blockade of L-arginine uptake, depletion of intracellular L-arginine and inhibition of nitric oxide synthase (Closs *et al*, 1997; McDonald *et al*, 1997; Ribeiro *et al*, 1997).

To discriminate γ^+ and γ^+L activities, cells are usually pre-incubated in N-ethylmaleimide (NEM) (Devés, Angelo & Chávez, 1993) for 10 minutes at 37°C, a condition known to selectively inhibit the γ^+ system (Forray *et al* 1995; Ribeiro *et al*, 1996). However, it is known that previous exposition of cells to physiological temperature (37°C) depletes

the basal arginine intracellular pool, and alters kinetic parameters of membrane transporters (Stein, 1990). As a consequence, an incorrect estimative of the maximal transport capacity (V_{max}) and half-saturation constant (k_m) may result from measurements performed under these experimental conditions.

The aim of this work was to verify the ideal temperature conditions for pre-incubation of cells with the inhibitor, when evaluating transport function of y^+ and y^+L systems separately.

MATERIALS AND METHODS

The study protocol was approved by the Scientific and Ethics Committees of the of Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Erythrocytes obtained from the Blood Bank of the Hospital São Lucas–PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil, were used as cell model.

L-arginine uptake was measured using established protocols for erythrocytes transmembrane flux experiments (Young & Ellory, 1982). After an initial centrifugation (3000g, 10min) of the blood, the erythrocytes were separated, and washed rapidly three times by centrifugation (3000 g, 2 min) in ice-cold saline with the following composition (mM): glucose 10, KCl 5, NaCl 140, 4-morpholinepropanesulphonic acid 10, pH 7.4. Cells were resuspended in ice-cold saline to achieve a haematocrit of 8-11% (determined spectrophotometrically) and stored at 4°C. Aliquots of 0.225mL of cell suspension were added to 0.05mL of ice-cold saline or NEM stock solution (8µM, Sigma Chem. Co.). Duplicated tubes with and without NEM were maintained at 4°C or 37°C for the indicated time, and then transferred to an ice-bath for at least three minutes. Cold saline and L-

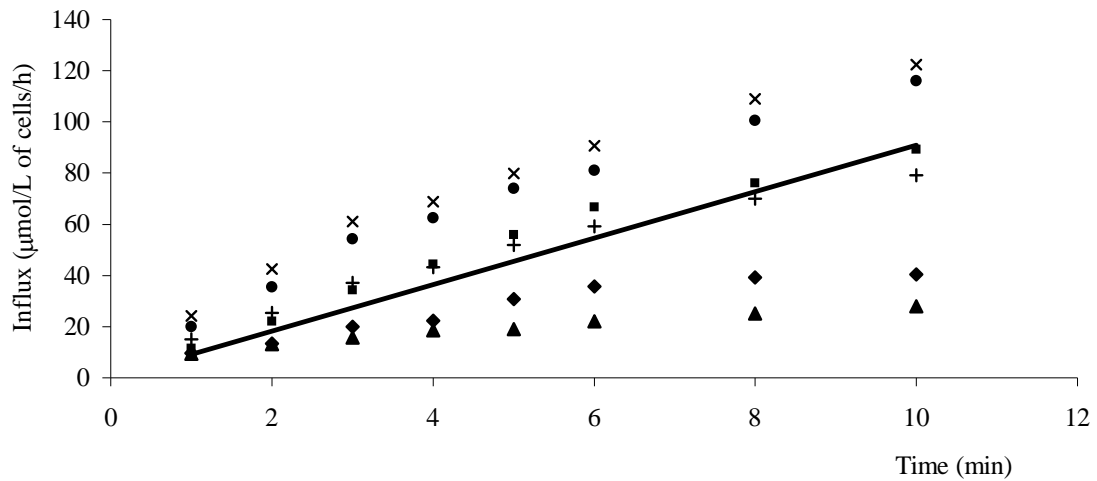
arginine (1111 μ M, Sigma Chem. Co.) containing trace amounts of [14 C]L-arginine (50 μ Ci/mL, supplied by Amersham Biosciences) were added to the tubes to give 8.8-300 μ M L-arginine final concentration, in a final volume of 500 μ L. Cells were incubated at 37°C for 3 minutes, and the flux was stopped on ice. After, the erythrocytes were washed free of extracellular radioactivity by three centrifugation (15000g, 5s)/washes in ice-cold saline. Cell pellet containing intracellular beta-emitters were lysed with 0.25mL 0.1% (v/v) Triton X-100, and subsequently deproteinized by the addition of 0.25mL 5% (w/v) trichloroacetic acid. Protein was precipitated by centrifugation (15000g, 5min) and the supernatant was added to vials containing scintillation fluid and counted in a Beckman LS6500 counter. Initial influx rate of L-arginine was expressed in μ mol/L of cells/h.

Most experiments were performed immediately after erythrocyte preparation. Some experiments were performed under zero-trans conditions (ZT) by pre-incubating cells at an 1% haematocrit in saline at 37°C for 3 hours with constant shaking before flux measurements were made. This procedure depletes the intracellular substrate pool.

The data was fitted in Michaelis Menten kinetics (by using the computer software Enzfitter for MS-DOS), and L-arginine V_{max} and k_m were determined.

Data are expressed as mean \pm standard deviation. Statistical significance was assessed with two tailed-paired Student's t tests and ANOVA, with $p < 0.05$ being considered significant.

Figure 1 – Time course of L-arginine influx in erythrocytes (extracellular arginine concentration of 500 μ M).



RESULTS

Preliminary experiments have shown that total L-arginine flux was linear when cells were incubated at 37°C for 3 minutes (Figure 1). This condition was thus chosen for analyzing L-arginine influx.

Table 1 shows erythrocyte total L-arginine uptake and y^+ fluxes measured at two different NEM pre-incubation temperatures (37° and 4°C). The V_{max} of total L-arginine uptake was higher when pre-incubation was performed at 4°C as compared to 37°C, suggesting that depletion of intracellular substrates occurred at physiological temperature. No significant difference was seen in the transporter affinity (k_m).

Table 1 – L-arginine uptake kinetics (mean \pm SD) at different NEM pre-incubation temperatures.

NEM pre-incubation temperature	Transport systems	V _{max} *	K _m *
		(n=6)	(n=6)
37°C	y ⁺ and y ^{+L}	913.2 \pm 608.3*	47.4 \pm 28.2
	y ^{+L}	148.8 \pm 78.3	9.9 \pm 5.6
4°C	y ⁺ and y ^{+L}	1213.7 \pm 827.9*	55.1 \pm 30.8
	y ^{+L}	149.0 \pm 77.9	8.6 \pm 6.0

* p<0.05 Student's t test for paired samples: 4 and 37°C total fluxes comparisons; V_{max}: μmol/L of cells/h e k_m: μmol/L.

Table 2 depicts L-arginine uptake (V_{max}) measured with and without NEM pre-incubation for different time periods under both experimental temperatures. It can be seen that total V_{max} decreases with incubation time when NEM was employed at 37°C. It also shows that 1 minute of cells pre-incubation with NEM is enough to inhibit y⁺ carrier.

Table 2 – L-arginine maximal capacity of transport (in $\mu\text{mol/L}$ of cells/h) at different NEM incubation time under both experimental conditions (37°C and 4°C).

NEM pre-incubation temperature (10min)	Transport systems	Time (minutes)				
		1*	5*	10*	20*	30*
37°C	y ⁺ and y ^{+L} *	574.8	527.1	439.7	368.6	373.3
		± 215.4	± 189.2	± 143.7	± 115.4	± 122.0
	y ^{+L}	135.7	141.2	143.9	137.6	137.8
		± 30.8	± 33.8	± 27.5	± 31.8	± 38.2
4°C	y ⁺ and y ^{+L}	522.3	596.3	569.5	556.9	588.0
		± 209.3	± 217.3	± 206.2	± 217.3	± 226.9
	y ^{+L}	145.3	129.3	128.9	132.9	133.7
		± 26.7	± 17.6	± 21.1	± 26.8	± 19.0

Data are expressed as means \pm SD(n=6); influx in $\mu\text{mol/L}$ of cells/h; *ANOVA $p < 0.05$.

Figure 2 illustrates L-arginine uptake at different erythrocytes incubation times in saline, showing that 3 hours was enough to achieve zero-trans. Total and y^{+L} L-arginine uptake were evaluated in red cells under zero-trans conditions (Table 3). Kinetic parameters (V_{max} and k_m) of both transporters systems were very similar, independent of the pre-incubation temperature.

Figure 2 – L-arginine influx at 500µM extracellular concentration. Fluxes were performed with immediately washed cells (time 0) and at every hour after the cells had been incubated at a haematocrit < 1% at 37°C in L-arginine-free saline. Influx rates reached steady-state condition after 2 to 3 hours.

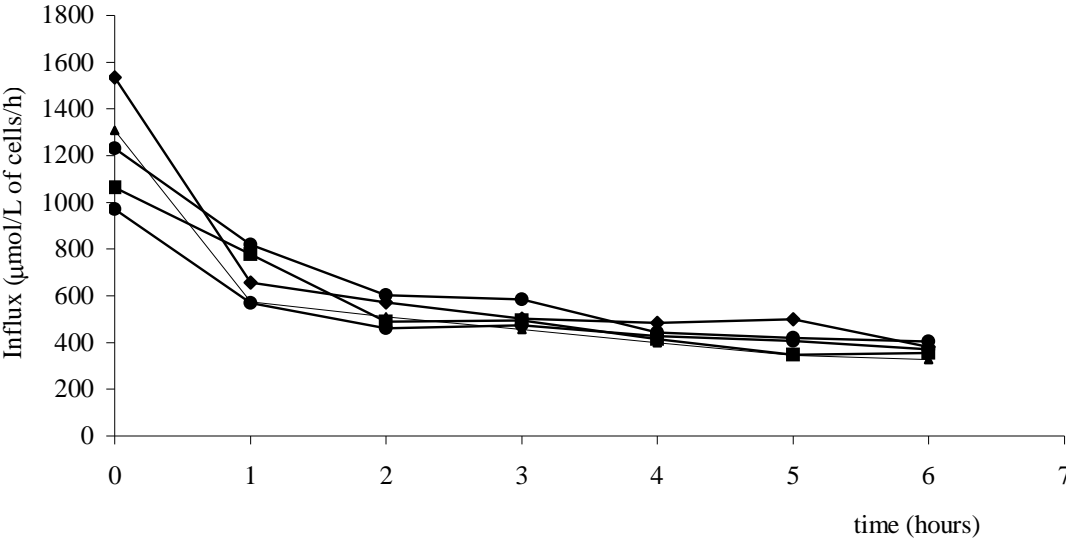


Table 3 – L-arginine uptake kinetics (mean \pm SD) at different NEM pre-incubation temperature in zero-trans conditions.

NEM pre-incubation temperature (10 min)	Transport systems	V_{\max} (n=6)	k_m (n=6)
37°C	y ⁺ and y ⁺ L	175.5 \pm 118.6	33.2 \pm 13.8
	y ⁺ L	36.1 \pm 7.9	10.2 \pm 3.7
4°C	y ⁺ and y ⁺ L	170.9 \pm 106.4	29.0 \pm 7.7
	y ⁺ L	39.3 \pm 10.6	7.4 \pm 3.5

No statistic difference were detected by Student's t test for paired samples; V_{\max} : $\mu\text{mol/L}$ of cells/h and k_m : $\mu\text{mol/L}$.

DISCUSSION

It is well known that when cells are maintained at 37°C before measurements, exchanges occur between intra and extracellular environments (Stein, 1990). Here, we showed that a mischaracterization of the L-arginine transporters activity might result if cells are kept at 37°C during the pre-incubation time with NEM, needed to block y⁺ carrier. Our data demonstrated that NEM pre-incubation in a ice-bath inhibits erythrocyte y⁺ activity in one minute (Table 3). These results indicated the need of a small, but important, modification to be introduced in protocols used for specific uptake measurements. Thus, when performing experiments which needs NEM to block y⁺ system, cells should be kept

at ice-cold temperatures, in the same way as the cells used for evaluating total uptake. The 10 minutes NEM pre-incubation at 37°C, a commonly used protocol, is not needed.

Studies comparing normal and pathological subjects could be specially affected by this condition. In cases of diseases in which the intracellular amino acid content is increased (Pinheiro da Costa *et al*, 2004; Ferverza *et al*, 1989; Ferverza *et al*, 1991; Ribeiro *et al*, 1999), trans-stimulation is higher and, consequently, the loss to the extracellular environment is faster than in controls cells. Under this condition, a ten minutes time interval to prepare cells could result in a smaller difference in the kinetic parameters and similar values between case and control subjects. Alternatively, if diseased cells have a decreased amino acid pool as compared to normal cells, the kinetics parameters could be underestimated by a prolonged incubation time.

Our results showed alterations only in red cell maximal transport capacity, with the different protocols. Affinity was not affected by temperature of pre-incubation either in fresh cells or in zero-trans conditions. In fact, as shown here, previous amino acids cell depletion may constitute a more favorable condition to investigate carrier-mediated transport. However, in this case it is important to have data on the trans-stimulated status because the levels of analogs are altered in many diseases (Closs *et al*, 1997; Forray *et al*, 1995; Ribeiro *et al*, 1996).

Several studies investigate the L-arginine nitric oxide pathway (Forray *et al*, 1995; McDonald *et al*, 1997; Ribeiro *et al*, 1996; Ribeiro *et al*, 1997), and the L-arginine paradox is a novel theory often mentioned (Tsikas *et al*, 2000; Kronon *et al*, 1999). The arginine paradox refers to the phenomenon that exogenous L-arginine causes NO-mediated biological effects despite the fact that nitric oxide synthases are theoretically saturated with the substrate L-arginine (Tsikas *et al*, 2000). In this case, up-regulation of γ -L activity (Ribeiro

et al, 1999) could explain the paradoxical situation. Since the y^+ is a system characterized by high capacity and low affinity for the substrate (Déves & Boyd, 1998), it may accumulate other substrates into the cellular compartment such as L-arginine analogs, thereby causing inhibition of nitric oxide synthase. The cellular membrane has a caveolar complex located between y^+ and endothelial nitric oxide synthase (McDonald *et al*, 1997), suggesting a mechanism for a directed delivery of L-arginine to this enzyme. Direct transfer of extracellular L-arginine to membrane-bound nitric oxide synthase accounts for the arginine paradox, explaining why caveolar location of nitric oxide synthase is required for optimal endothelial nitric oxide production (Poli de Figueiredo *et al*, 2001). The data we presented in this paper suggested that when cells are incubated at 37°C the activity of y^+ transporter could be underestimated, and if this happens, the activity of y^+L system in relation to total influx would be also misinterpreted.

The present data suggests a modification in the assay protocol, eliminating the pre-incubation time with NEM for 10 minutes at 37°C, for measuring erythrocyte y^+ and y^+L membrane transporters independently.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Blood Bank of the São Lucas Hospital for providing us with blood samples, and Dr Célia Carlini for critical review of the manuscript. The Nephrology Laboratory is supported by Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul (SCT-RS), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and PUCRS, Brazil.

BIBLIOGRAPHY

Boyd, C.A.R., Crawford, D.H. 1992. Activation of cationic amino acid transport through system γ^+ correlates with expression of the T-cell early antigen gene in human lymphocytes. *Pflügers. Arch.* 422: 87-89.

Christensen, H.N. 1990. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol. Rev.* 70(1): 43-77.

Christensen, H.N., Antonioli, J.A. 1969. Cationic amino acid transport in the rabbit reticulocyte. Na^+ -dependent inhibition of Na^+ -independent transport. *J. Biol. Chem.* 244: 1497-1504.

Closs, E.I., Basha, F.Z., Habermeier, A., Förstermann, U. 1997. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the γ^+ carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide.* 1(1): 65-73.

Devés, R., Boyd, C.A.R. 1998. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure and function. *Physiol. Rev.* 78(2): 487-545.

Devés, R., Angelo, S., Chávez, P. 1993. N-ethylmaleimide discriminates between two lysine transport systems in human erythrocytes. *J. Physiol.* 468: 753-766.

Devés, R., Chavez, P., Boyd, C.A.R. 1992. Identification of a new transport system (γ^+L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J. Physiol.* 454: 491-501.

Fervenza, F.C., Harvey, C.M., Hendry, B.M., Ellory, J.C. 1989. Increased lysine transport capacity in erythrocytes from patients with chronic renal failure. *Clin. Sci.* 76: 419-422.

Fervenza, F.C., Meredith, D., Ellory, J.C., Hendry, B.M. 1990. A study of the membrane transport of aminoacids in erythrocytes from patients on haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transpl.* 5: 594-599.

Fervenza, F.C., Meredith, D., Ellory, J.C., Hendry, B.M. 1991. Abnormal erythrocyte choline transport in patients with chronic renal failure. *Clin. Sci.* 80: 137-141.

Forray, M.I., Angelo, S., Boyd, C.A.R., Déves, R. 1995. Transport of nitric oxide synthase inhibitors through cationic amino acid carriers in human erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.* 50(12): 1963-1968.

Furesz, T.C., Moe, A.J., Smith, C.H. 1991. Two cationic amino acid transport systems in human placental basal plasma membranes. *Am. J. Physiol.* 261: C246-C252.

Kronon, M.T., Allen, B.S., Halldorsson, A., Rahman, S., Wang, T., Ilbawi, M. 1999. Dose dependency of L-arginine in neonatal myocardial protection: the nitric oxide paradox. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 118(4): 655-664.

McDonald, K.K., Rouhani, R., Handlogten, M.E., Block, E.R., Griffith, O.W., Allison, R.D., Kilberg, M.S. 1997. Inhibition of endothelial cell amino acid transport System y⁺ by arginine analogs that inhibit nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Acta.* 1324: 133-141.

McDonald, K.K., Zharikov, S., Block, E.R., Kilberg, M.S. 1997. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J. Biol. Chem.* 272(50): 31213-31216.

Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43(2): 109-142.

Palacín, M., Estévez, R., Bertran, J., Zorzano, A. 1998. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* 78(4): 969-1054

Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S. 1988. Vascular endothelial cells synthesis nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 333: 664-666.

Pinheiro da Costa, B., Steibel J.P., Antonello I.C., Guimarães J.A., Poli de Figueiredo C.E. 2004. L-Arginine erythrocyte transport in normal pregnant and preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol* 190(2): 468-71.

Poli de Figueiredo, CE., Ellory, J.C., Hendry, B.M. 1992. Erythrocyte choline uptake after renal transplantation. *Lancet*. 339: 146-148.

Poli de Figueiredo, C.E., Pinheiro da Costa, B.E., Comerlato, L., Micheli, E., Barros, E. 2001. Low dose L-arginine reduces blood pressure and endothelin-1 production in hypertensive uraemic rats. *Nephrol. Dial. Transplant. (Lett.)* 16: 2110-2111.

Ribeiro, A.C.M., Brunini, T.M.C., Yaqoob, M., Aronson, J.K., Mann, G.E., Ellory, J.C. 1999. Identification of system y⁺L as the high-affinity transporter for L-arginine in human platelets: up-regulation of L-arginine influx in uremia. *Eur. J. Physiol.* 438: 573-575.

Ribeiro, A.C.M., Hanssen, H., Kiessling, K., Roberts, N.B., Mann, G.E., Ellory, J.C. 1997. Transport of L-arginine and the nitric oxide inhibitor NG-monomethyl-L-arginine in human erythrocytes in chronic renal failure. *Clin. Sci.* 93: 57-64.

Ribeiro, A.C.M., Roberts, N.B., Lane, C., Yaqoob, M., Ellory, J.C. 1996. Accumulation of the endogenous L-arginine analogue NG-monomethyl-L-arginine in human end-stage renal failure patients on regular haemodialysis. *Exp. Physiol.* 81: 475-481.

Rubython, J., Morgan, D.B. 1983. The effect of pregnancy induced hypertension on active sodium transport in the erythrocyte. *Clin. Chim. Acta.* 132: 91-99.

Speak PF, Glazier JD, Ayuk PT, Reade M, Sibley CP, D' Souza SW. 2003 L-arginine transport across the basal plasma membrane of the syncytiotrophoblast of the human

placenta from normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(9):4287-92

Stein, W.D. 1990. Carrier-mediated transport: facilitated diffusion. In: *Channels, Carriers and Pumps. An Introduction to membrane transport.* W.D. Stein, editor. pp. 127-171. San Diego, California.

Tsikas, D., Boger, R.H., Sandmann, J., Bode-Boger, S.M., Frolich, F.C. 2000. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS. (Lett.)* 478(1-2):1-3.

Valle, A.E., Paz, J.C., Sánchez-Jimenez, F., Medina, M. A. 2001. Agmatine uptake by cultured hamster kidney cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 280: 307-311.

Welt, L.G., Sachs, J.R., McManus, T.J. 1964. An ion transport defect in erythrocytes from uremic patients. *Trans Assoc Amer Phys.* 77:169-181.

Young, J., Ellory, J.C. 1982. Flux measurements. In: *Red cell membranes. A methodological approach.* J.C. Ellory, J.D. Young, editors. pp. 119-133. New York, New York.

ANEXO 5

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

IDENTIFICAÇÃO

CASO N°: _____ REGISTRO: _____ DATA DA CONSULTA: ____/____/____

NOME COMPLETO: _____

DN: ____/____/____ SEXO: 1. Masculino 2. Feminino

COR: 1. Negra 2. Branca 3. Mista PROFISSÃO: _____

ESTADO CIVIL: 1. Com companheiro(a) 2. Sem companheiro(a)

ESCOLARIDADE: 1. Não estudou 4. 2º grau incompleto

2. 1º grau incompleto 5. 2º grau completo

3. 1º grau completo 6. Pós-graduação

ENDEREÇO RESIDENCIAL: _____ FONE: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____ CEP.: _____

ENDEREÇO PROFISSIONAL: _____ FONE: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____ CEP.: _____

NOME DE PARENTE/AMIGO: _____

ENDEREÇO RESIDENCIAL: _____ FONE: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____ CEP.: _____

DADOS DE HISTÓRIA01. O paciente sabe ter pressão alta? 1. Sim 2. Não (*vá para a 24 se paciente for ♀ e 30 se for ♂*)

02. Em caso afirmativo, como soube?

1. Médico 4. Medidores de rua/supermercado 8. Não se aplica

2. Enfermeiro/auxiliar 5. Suspeita ter 9. Não se lembra

3. Banco de sangue 6. Pré-natal 10. Outros: _____

03. Com que idade foi diagnosticado pressão alta? _____ anos (*Se paciente for ♂ vá para a pergunta 19*)

04. Em caso de doença hipertensiva na gestação atual ou recente (puerpério), desde quando sabe ter pressão alta:

1. Antes da gestação 3. Após a 20ª semana de gestação

2. Antes da 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 DOSE
1.	_____	_____	_____	_____	_____
2.	_____	_____	_____	_____	_____
3.	_____	_____	_____	_____	_____

20. Que medicamentos usou anteriormente para a pressão?

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

21. Assinale os motivos para o abandono:

- 1. Efeitos adversos
- 2. Achou que estava curado
- 3. Custo
- 4. O médico mandou parar
- 5. Achou que a pressão baixou demais
- 6. Outro: _____
- 8. Não se aplica
- 9. Não se lembra

22. Houve recomendação de tratamento não-farmacológico prévio?

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

23. Quais das medidas recomendadas o paciente segue?

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

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

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

30. Revisão de sistemas:

1. Retina: _____
2. Coração: 1. Precordialgia 2. Palpitações 3. Dispneia 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. _____	___/___/___	_____	1. _____	___/___/___	_____
2. _____	___/___/___	_____	2. _____	___/___/___	_____
3. _____	___/___/___	_____	3. _____	___/___/___	_____

38. Anote outras doenças que o paciente refere ter:

DIAGNÓSTICO	DATA	CID	DIAGNÓSTICO	DATA	CID
1. _____	___/___/___	_____	1. _____	___/___/___	_____
2. _____	___/___/___	_____	2. _____	___/___/___	_____
3. _____	___/___/___	_____	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 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 MSD:** _____ / _____ mmHg

PA MSE: _____ / _____ mmHg

PA DLE: _____ / _____ mmHg

Fim da consulta: **PA MSE ou DLE:** _____ / _____ mmHg

46. FREQUÊNCIA CARDÍACA: _____ bpm

47. PESO: _____ Kg 48: ALTURA: _____ cm 49: IMC: _____
50. CIRCUNFERÊNCIA 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 pré-córdio? 1. Não há sopros 2. Com sopros
55. O ritmo cardíaco é:
1. Regular 2. Irregular, sugere extrassistolia
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, sobre a 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 bilateralmente 6. Diminuído à E 10. Com sopro (femorais)
- Pulso braquial: _____ Pulso tibial anterior: _____ Pulso femural: _____
- 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 sensibilidade 11. Alteração par craneano: _____
12. Outra: _____
64. Anormalidades do fundo de olho:
1. Sem anormalidades 3. Apagamento venoso 5. Exsudatos 7. Edema de papila
2. Estreitamento arteriolar 4. Represamento venoso 6. Hemorragias

RESULTADOS DE EXAMES COMPLEMENTARES

65. Exame qualitativo de urina:

- 1. pH: _____
- 2. densidade: _____
- 3. Sem alterações
- 4. Hematúria: _____ hem p/c
- 5. Leucocitúria: _____ leuc p/c
- 6. Proteinúria: _____ +
- 7. Glicosúria: _____ +
- 10. Cilindros granulosos: _____
- 11. Cilindros hialinos: _____
- 12. Cilindros hemáticos: _____
- 66. Proteinúria/amostra: _____ mg/dL
- 67. Creatininúria/amostra: _____ mg/dL
- 68. Prt/Cr: _____
- 69. Proteinúria / 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. Triglicerídeos: _____ mg/dL
- 81. Hematócrito: _____ %
- 82. Hemoglobina: _____ g/dL
- 83. Leucócitos: _____ / μ L
- 1. Desvio à E
- 2. Desvio à D
- 84. Plaquetas: _____ / μ L
- 85. ECG: _____
- 86. Rx tórax: _____

LISTA DE PROBLEMAS

Anotar lesões em órgãos-alvo:

	DIAGNÓSTICO	CID
1.	_____	_____
2.	_____	_____
3.	_____	_____
4.	_____	_____
5.	_____	_____
6.	_____	_____
7.	_____	_____
8.	_____	_____
9.	_____	_____
10.	_____	_____

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 e carboidratos refinados | 7. Realizar exercícios físicos |
| 4. Reduzir a ingestão de sal | 10. Substituir a anticoncepção hormonal |

D. Tratamento medicamentoso recomendado:

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

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 total/vias urinárias |
| 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 BÁSICOS: _____

ANEXO 6

**HOSPITAL SÃO LUCAS
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
AMBULATÓRIO DE DOENÇAS HIPERTENSIVAS
FICHA DE 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 DOSE
1.	_____	_____	_____	_____	_____
2.	_____	_____	_____	_____	_____
3.	_____	_____	_____	_____	_____

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

DADOS DE EXAME FÍSICO

45. PRESSÃO ARTERIAL Manguito: _____ cm

Início da consulta: **PA M S D:** ____ / ____ mmHg

PA M S E: ____ / ____ mmHg

PA D L E: ____ / ____ mmHg

Fim da consulta: **PA M S E ou D L E:** ____ / ____ mmHg

46. FREQUÊNCIA CARDÍACA: _____ bpm

47. PESO: _____ Kg 48. ALTURA: _____ cm 49. IMC: _____

50. CIRCUNFERÊNCIA 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 pré-córdio? 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, sobre a 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 bilateralmente 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 sensibilidade 11. Alteração par craneano: _____
12. Outra: _____
64. Anormalidades do fundo de olho:
3. Sem anormalidades 3. Apagamento venoso 5. Exsudatos 7. Edema de papila
4. Estreitamento arteriolar 4. Represamento venoso 6. Hemorragias

RESULTADOS DE 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 68. Prt/Cr: _____
69. Proteinúria / 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. Triglicerídeos: _____ mg/dL
81. Hematócrito: _____ % 82. Hemoglobina: _____ g/dL
83. Leucócitos: _____ / μ L 1. Desvio à E 2. Desvio à D
84. Plaquetas: _____ / μ L
85. ECG: _____
86. Rx tórax: _____

LISTA DE PROBLEMAS

Anotar lesões em órgãos-alvo:

	DIAGNÓSTICO	CID
1.	_____	_____
2.	_____	_____
3.	_____	_____
4.	_____	_____
5.	_____	_____
6.	_____	_____
7.	_____	_____
8.	_____	_____
9.	_____	_____
10.	_____	_____

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 e carboidratos refinados | 7. Realizar exercícios físicos |
| 4. Reduzir a ingestão de sal | 10. Substituir a anticoncepção hormonal |

D. Tratamento medicamentoso recomendado:

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

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 total/vias urinárias |
| 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 BÁSICOS: _____

ANEXO 7

L-ARGININE UPTAKE IN WOMEN WITH AND WITHOUT THE HYPERTENSIVE DISORDERS OF PREGNANCY: SYSTEMS y^+ AND y^+L

Ioná Rosine Scolari Conceição, Bartira Ercília Pinheiro da Costa, Ivan Carlos Ferreira Antonello, Domingos O. L. D'Ávila, Carlos Eduardo Poli de Figueiredo.

Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde (Nefrologia), Instituto de Pesquisas Biomédicas/Faculdade de Medicina/Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil.

Sources of Financial Support: The Nephrology Laboratory (IPB) is supported by PUCRS, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), and by the Nephrology Division HSL.

Address for correspondence:

Poli de Figueiredo, CE.

Centro Clínico PUCRS Conjunto 414

Avenida Ipiranga 6690

Porto Alegre, CEP 90610-000, RS, Brasil

e-mail: cepolif@pucrs.br

Phone: ++ 55 51 3367700

Fax: ++ 55 51 3203312

Short Title: L-arginine uptake and hypertension in pregnancy.

ABSTRACT

L-arginine is the precursor of nitric oxide - a potent endogenous vasodilator. This amino acid is transported via two membrane transport systems: y^+ and y^+L . Total L-arginine erythrocyte maximal capacity is increased in preeclampsia syndrome. The hypothesis of the present study is that erythrocyte L-arginine transport alterations are associated with arterial hypertension. The aim was to evaluate the activity of y^+ and y^+L erythrocyte membrane transport systems of L-arginine, in normotensive and hypertensive women, and women with and without the hypertensive disorders of pregnancy.

Sample was composed by 137 women divided into followed groups: 39 with preeclampsia (PE), 8 with superimposed preeclampsia (SPE), 14 with gestational hypertension (GH), 10 with chronic hypertension (CH), 28 pregnant controls (CP), 20 non-pregnant hypertensive (HAS) and 18 non-pregnant normotensive women (N). L-arginine erythrocyte uptake was measured using ^{14}C as a marker, and N-ethylmaleimide as y^+ transport system inhibitor to obtain the function of two transport systems separately. Results were submitted to Michaelis-Menten equation to determine the maximal capacity of transport (V_{max}) and half saturation constant (k_m).

No significant alteration in total and y^+L V_{max} was detected between groups. The maximal capacity of transport via y^+ system was lower in PE, CH and CP in comparison with normotensive women. Half saturation constant (k_m) had no difference between groups.

Key words: Cationic Amino Acid Transporter; Hypertension, pregnancy-induced; Erythrocytes; Nitric oxide; Blood pressure; Preeclampsia.

Preeclampsia is a hypertensive disorder of human pregnancy associated with increased urinary protein excretion in women after the 20th week of pregnancy, still a major cause of maternal and fetal morbidity (Gifford *et al*, 2000), and occurs in 4.6% of low-risk pregnancies at São Lucas Hospital (Galão *et al*, 2004). The cause of preeclampsia remains unknown. This syndrome is characterized by vasoconstriction, activation of the coagulation system and reduced uteroplacental perfusion. The main pathologic changes are primary ischemic affecting several organs, and endothelial dysfunction has been suggested. The increased peripheral vascular resistance seems to be due to enhanced responsiveness to the action of vasopressor agents, and reduced action of vasodilator systems. Alterations in the L-arginine-nitric oxide pathway have been suggested (Baylis *et al*, 1998; Morris *et al*, 1996).

Nitric oxide (NO), which is synthesized from the amino acid L-arginine, is a potent vasodilator and involved in platelet aggregation (Moncada & Higgs, 1993). The first step for NO production is cellular uptake of L-arginine via amino acid transporter systems (Devés & Boyd, 1998.). L-arginine enters the erythrocyte via cationic amino acid transporter systems, such as y^+ and y^+L systems (Devés & Boyd, 1998). The cationic amino acid transporter systems found in endothelial cells mediating the transport of L-arginine are also present in erythrocytes. In addition erythrocytes are a useful model to study membrane transport (Ellory & Lew, 1977).

We have previously shown increased erythrocyte total L-arginine maximal capacity of uptake in patients with preeclampsia syndrome in comparison to normal pregnant women (Pinheiro da Costa *et al*, 2004). Increased mean maximal capacity of transport in erythrocytes, in preeclamptic women, was disclosed in comparison with normal pregnant women.

The aim of the present study was to evaluate the activity of γ^+ and γ^+ L erythrocyte membrane transport systems of L-arginine, in normotensive and hypertensive women, and women with and without the hypertensive disorders of pregnancy.

PATIENTS AND METHODS

Participants

The study protocol was approved by the Scientific and Ethics Committees of the Medical School and São Lucas Hospital of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. All patients were clarified of the research aims, risks and benefits and were included only after informed consent was given.

Preeclampsia was defined as suggested by the National High Blood Pressure Education Program Working Group (Gifford et al, 2000). Hypertension was considered when systolic blood pressure exceeded 140 mmHg and diastolic blood pressure 90 mmHg. Proteinuria was measured by acid precipitation with turbidimetric read, in random urine and the proteinuria/creatininuria ratio was used to estimate 24-hour protein excretion. Results were reported in mg/24 hours.

Sample was composed by 137 women divided into 7 groups of pregnant and non-pregnant women: Pregnant - preeclampsia (PE, n=39), superimposed preeclampsia (SPE, n=8), gestational hypertension (GH, n=14), chronic hypertension (CH, n=10), and normal control pregnancy (CP, n=28); and Non-pregnant - hypertensive (HAS, n=20) and normotensive (N, n=18). Preeclampsia (PE) was considered when pregnant woman developed hypertension after the 20th week of pregnancy in a previously normotensive associated with proteinuria exceeding 300 mg/24 hours. Superimposed preeclampsia (SPE) when a previously hypertensive woman developed preeclampsia or persisted with hypertension after

12 weeks of delivery. Gestational hypertension (GH) was diagnosed hypertension developed after the 20th week of gestation without proteinuria, and become normotensive following delivery. Chronic hypertension (CH) was diagnosed when pregnant woman had previous history of hypertension, the presence of hypertensive retinopathy or persisted hypertensive following 12 weeks of delivery. Control pregnancy (CP) and non-pregnant normotensive (N) were considered in women who never developed preeclampsia during pregnancy, had no past history of high blood pressure, diabetes, renal, cardiovascular or thyroid diseases; besides women had also a normal urine sediment and a normal fundii. Hypertensive (HAS) women were those non-pregnant with a previous diagnosis of essential hypertension.

Pregnant women were selected from patients attending to the Obstetric Department at São Lucas Hospital – PUCRS, a University Hospital in Southern Brazil. The gestational age was defined according to a reliable date of the last menstrual period or by early (<12 weeks) ultrasound evaluation.

Erythrocyte L-arginine uptake

Blood collected in heparinized tubes was centrifuged and washed three times with ice-cold saline solution (platelets/white cell layer discarded) for separation of erythrocytes. All samples were kept in ice until uptake assays were performed. Erythrocytes were separated into two aliquots, one was incubated with N-ethylmaleimide (NEM) prior to uptake measurements.

Total erythrocyte L-arginine uptake was determined by incubating cells for three minutes at 37°C (pH 7.4) in a water bath with progressive L-arginine concentrations (8.8, 15.5, 24.5, 51, 100 and 300 $\mu\text{mol/L}$) and ^{14}C as a marker. Uptake was interrupted by transferring the sample tubes into ice. Erythrocytes

were then washed free of extracellular radioactivity, lysed (triton 0,1% v/v), and protein-precipitated (trichloroacetic acid 5% w/v) to recover their intracellular content, followed by radioactivity counting in a liquid-scintillation counter. Uptake was corrected to $\mu\text{mol/L cells/h}$. Maximal transport capacity (V_{max} in $\mu\text{mol/L cells/h}$) and half-saturation (k_m in $\mu\text{mol/L}$) were derived from Michaelis-Menten kinetics, using a computer software (Enzfitter for MS-DOS). All L-arginine uptake assays were performed in duplicate. NEM, 0.8 mM, was used to measured the NEM-insensitive fluxes – corresponding to the activity of the y^+L system. The NEM-sensitive uptake was considered as the uptake via the y^+ system.

Statistics

Mean, standard deviation were calculated for all variables. Student's t test and chi-square (χ^2) were employed. A $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. The Statistical Package for the Social Sciences was used for all analyses.

RESULTS

Clinical characteristics of the study and control groups are shown in Table 1.

Michaelis-Menten kinetics of L-arginine uptake via y^+ and y^+L systems are shown in Table 2 and 3. The total maximal capacity of L-arginine uptake (V_{max}) through y^+ system was different between groups, being significantly increased in N when compared with PE, CH and CP groups. No significant difference in the

half-saturation constant (k_m) for total transport and for systems y^+ and y^+L was detected.

DISCUSSION

Transport kinetics of the erythrocyte L-arginine transport were evaluated in five distinct groups of pregnant women (PE, SPE, GH, CH and CP) and two groups of non-pregnant women (HAS and N), through L-arginine transporters, y^+ and y^+L . No statistically significant difference was disclosed for total and y^+L maximal capacity of transport. On the other hand the maximal capacity of transport through system y^+ was higher in non-pregnant controls (N) when compared with preeclampsia, gestational hypertension and normal pregnant individuals. Even if we consider preeclampsia syndrome as a diagnosis (PE and SPE together), with a higher total L-arginine maximal capacity of transport in comparison to normal pregnant women, no statistically significant difference is disclosed; a result that disagrees with our previous study (Pinheiro da Costa *et al*, 2004), in which the total maximal capacity of L-arginine transport was higher in preeclampsia syndrome. Besides, we could not detect any other significant differences in total V_{max} between groups preeclampsia and superimposed preeclampsia, and between the other pregnant and nonpregnant groups. The present study can not confirm the hypothesis that the abnormalities previously described are secondary to systemic arterial hypertension.

There several aspects that may justify such disagreement, such as sample size, multiple comparison groups, heterogeneous baseline characteristics of the groups and lack of precision in the clinical diagnosis and classification of the hypertensive disorders of pregnancy. The sample sizes disequilibrium between

groups impairs the precision of the statistical analysis. The absolute y^+ system V_{\max} difference between N and PES is not significantly different, despite higher absolute difference in comparison to N versus PE which is significant – the standard deviations in the groups may account for such effect. Baseline clinical characteristics were heterogeneous in several aspects such as age, gender, race, number of pregnancies, weight, height and body mass index; in particular, attention must be paid to various gestational ages, which was lower in the group PES. A previous study may explain some of the findings, since the maximal capacity of transport was shown to increase with the progression of pregnancy (Galão *et al*, 2004). Other demographic differences could eventually account for such results, although we are not aware of any previous work that has examined differences in factors that characterize the groups such as hematocrit, uric acid, gender, age, number of pregnancies, body mass index and others. Pregnancy may be considered a stress test for women (Poli de Figueiredo *et al*, 2003; Williams, 2003), and is possible that the number of pregnancies may affect some of the metabolic and cellular responses in women - both, primigestae and multigestae, have been included. Besides, disease severity was not controlled. The interpretation of hypertension in pregnancy physiopathology is complicated by the lack of a precise definition of this disease, actually a maternal and fetal syndrome. This results in a disorder with an unknown etiology with multiple classifications.

A study by McCord and coworkers have shown, in peripheral mononuclear cells, increased L-arginine uptake via system y^+ in normal pregnancy, but not in preeclampsia in predominantly primigestae patients with 34 to 35 weeks gestation (McCord *et al*, 2006). Although transport data has been mentioned, the expression of one of the L-arginine transporter genes (CAT-2 mRNA), was not detected in nonpregnant women and in only 3/10 of the normal pregnancies and only 8/10 preeclamptic (McCord *et al*, 2006). Reduced y^+ maximal capacity of transport in

preeclampsia, gestational hypertension and normal pregnancy was found in the present study. Human placental L-arginine transport has also been studied indicating differences in transport between normal and preeclamptic pregnancies, and associations of transporter activity and gestational age (Ayuk *et al*, 2002; Speake *et al*, 2003). The effects of plasma and intracellular L-arginine concentration, and the levels of its analogs may have influenced the results. V_{\max} may be altered by substrate concentrations as a result of trans-stimulation, the acceleration of transporter activity by L-arginine, or other compatible substrates for the L-arginine transporters (Devés & Boyd, 1998). Endogenous analogs of L-arginine, such as asymmetric dimethyl arginine (ADMA), are increased in preeclampsia (Pettersson *et al*, 1998; Holden *et al*, 1998), and they also have affinity for L-arginine transporters (Devés & Boyd, 1998). These analogs are inhibitors of the nitric oxide synthases and would induce reduction in nitric oxide production (Devés & Boyd, 1998), despite L-arginine uptake. The combination of low plasma L-arginine levels and elevated ADMA concentration during the late phase of pregnancy complicated by preeclampsia led to the suggestion of a role of endogenous nitric oxide synthases inhibitors in the pathogenesis of preeclampsia (Pettersson *et al*, 1998), and previous papers suggests that one possible mechanism might be via altered L-arginine transporters. To avoid trans-stimulation experimental zero-trans conditions would be necessary.

It is possible that under this pathological setting the y^+ system alters its activity. Increased number of transport sites in the membrane or an increase in the turnover rate per transport site could both result in increased maximal capacity of transport. The overall effects may reflect that there maybe an intrinsic alteration in the membrane properties, and not only altered substrate concentrations. Pregnancy and hypertension in pregnancy may be associated with cell membrane adaptations resulting in transporter changes that would induce altered aminoacid transport kinetics. Little is known about the factors that regulate L-arginine

transport, especially in hypertension in pregnancy. It has been shown that L-arginine transport is regulated by factors such as protein kinase C and tumor necrosis factor (Pan *et al*, 1995; Haller *et al*, 1998). Haller and coworkers (Haller *et al*, 1998), using endothelial cells, have suggested that serum from preeclamptic patients may contain factors that increase cell permeability. It seems that several must be the determinants of L-arginine transport in pregnancy and preeclampsia, since there is a large flux variability, even in the control groups. The differences in our findings and in previous studies with similar methodology suggest that the kinetic parameters have a low sensitivity and specificity for the diagnosis and/or evaluation of physiopathological aspects of these conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Nephrology Laboratory is supported by PUCRS, Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul (SCT), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and by the Internal Medicine Department - Nephrology Division.

REFERENCES

Ayuk PT-Y, Theophanous D, D'Souza SW, Sibley CP, Glazier JD. L-arginine transport by the microvillous plasma membrane of syncytiotrophoblast from human placenta in relation to nitric oxide production: effects of gestation,

preeclampsia, and intrauterine growth restriction. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:747-51.

Baylis C, Beinder E, Sütö T, August P. Recent insights into the roles of nitric oxide and renin-angiotensin in the pathophysiology of preeclamptic pregnancy. *Semin Nephrol* 1998; 18(2):208-30.

Devés R, Boyd R. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure and function. *Physiol Rev* 1998; 78(2):487-545.

Ellory JC, Lew VL. Membrane transport in red cells. London: Academic Press; 1977.

Galão AO, Pinheiro da Costa BE, d'Avila D, Poli de Figueiredo CE. L-arginine erythrocyte transport increases during pregnancy and immediately portpartum. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:572-575.

Gifford RW, August PA, Cunningham G, Grenn LA, Lindheimer MD, Mcnellis D. National High Blood Pressure Education Program Working Group. Report on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:S1-S22.

Haller H, Hempel A, Homut V, Mandelkow A, Busjahn A, Maasch C, et al. Endothelial-cell permeability and protein kinase C in pre-eclampsia. *Lancet* 1998; 351:945-9.

Holden DP, Fickling SA, Whitley GS, Nussey SS. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178(3): 551-6.

McCord N, Ayuk P, McMahan M, Boyd RCA, Sargent I, Redman C. Systemic arginine transport and NO production in peripheral blood mononuclear cells in pregnancy and preeclampsia. *Hypertension* 2006; 47:109-115.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329:2002-12.

Morris NH, Eaton BM, Dekker G. Nitric oxide, the endothelium, pregnancy and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103(2):4-15.

Pan M, Wasa M, Lind DS, Gertler J, Abbott W, Souba WW. TNF-stimulated arginine transport by human vascular endothelium requires activation of protein kinase C. *Ann Surg* 1995; 221(5):590-601

Pettersson A, Hedner T, Milson I. Increased circulating concentrations of asymmetric dimethyl arginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis, in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 77:808-13.

Pinheiro da Costa B, 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.

Poli de Figueiredo CE, Pinheiro da Costa BE, Antonello IC, Valdes G, Germain AM. Pregnancy women's stress test. *BMJ* 2003; 326:845

Speake PF, Glazier JD, Ayuk PT-Y, Reade M, Sibley CP, D'Souza SW. L-arginine transport across the basal plasma membrane of syncytiotrophoblast of human placenta from normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4287-92.

Williams D. Pregnancy: a stress test for life. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003; 15(6):465-71.

Table 1. Demographic and clinical characteristics in the different groups.

Variable (unit)	PE (n=39)	SPE (n=8)	GH (n=14)	CH (n=10)	CP (n=28)	HAS (n=20)	N (n=18)	p (Anova)
Age (years)*	26.0 ±5.9 ^a	33.5 ±6.2	31.3 ±8.8	31.1 ±5.8	28.1 ±7.7	32.2 ±7.7 ^b	29.7 ±7.5	0.015
White n(%)	22(62.9) ^b	3(7.5) ^b	8(61.5) ^b	3(33.3)	17(81) ^b	14(70) ^b	18(100) ^a	0.004
Gestas (n)*	2.2±2.1 ^b	2.6±1.2	3.7±2.8 ^b	3.2±2.3 ^b	2.1±1.6	2.6±1.8 ^b	0.6±0.9 ^a	0.001
GA (weeks)*	35.3 ±4.2 ¹	31.6 ±5.6 ^a	37.6 ±3.0 ^b	35.9 ±3.3	39.1 ±2.2 ^{b,2}			<0.001
Weight (kg)	76±14 ^a	76±13	90±18 ^{b,2,B}	94±14 ^{b,2,B}	74±12 ¹	79±17 ^B	61±10 ^{b,A}	<0.001
Height (m)	1.60 ±0.06	1.60 ±0.03	1.60 ±0.06	1.60 ±0.04	1.59 ±0.07	1.58 ±0.05 ^a	1.64 ±0.07 ^b	0.033
BMI*	29±3.5 ^{b,1}	30±5.7 ^b	35±5.8 ^{b,2,B}	37±5.5 ^{b,2,B}	29±5.3 ^{b,A}	32±6.3 ^b	22±3.4 ^a	<0.001
SBP (mmHg)*	157 ±19.4 ^{b,2,B}	163 ±13.4 ^{b,2,B}	157 ±14.0 ^{b,2,B}	156 ±24.0 ^{b,2}	121 ±14.8 ^{1,B}	139 ±19.5 ^{b,2,A}	113 ±10.7 ^a	<0.001
DBP (mmHg)*	102 ±13.3 ^{b,2}	108 ±18.2 ^{b,2}	99 ±10.7 ^{b,2}	98 ±19.9 ^{b,2}	78 ±11.3 ¹	93 ±11.6 ^{b,2}	72 ±9.3 ^a	<0.001
MAP (mmHg)*	120.4 ±14.4 ^{b,2,B}	126.5 ±14.9 ^{b,2,B}	118.3 ±9.8 ^b	117.0 ±21.0 ^{b,2}	90.4 ±15.8 ¹	108.2 ±13.3 ^{b,2,A}	85.6 ±9.0 ^a	<0.001
Hct (%)*	34.7 ±3.3 ^{b,2}	36.1 ±2.9	34.6 ±4.3 ^b	35.6 ±3.2	32.5 ±2.9 ^{b,2}	37.6 ±2.7 ¹	38.4 ±2.5 ^a	<0.001
Hb (g/dL)*	11.7 ±1.2	12.5 ±0.9 ^b	11.5 ±1.5	11.9 ±1.5	10.8 ±1.2 ^a	12.4 ±1.1 ^b	12.8 ±0.8 ^b	<0.001
Platelets (/μL)	220931 ±58232	230000 ±104045	223182 ±73346	226833 ±55090	196667 ±53776	272118 ±76403	240500 ±53209	0.213
CR (mg/dL)*	0.82 ±0.11 ^b	0.80 ±0.12	0.75 ±0.07 ^{b,1}	0.83 ±0.13	0.76 ±0.11 ^b	0.94 ±0.14 ^a	0.91 ±0.11 ²	<0.001
UA (mg/dL)*	4.9±0.9 ^a	4.2±1.1	4.5±1.1	4.5±1.2	4.4±0.7	4.7±1.3	3.7±0.8 ^b	0.045
P/C 24h *	1,40 ±1,79 ^a	1,43 ±1,77 ^a	0,19 ±0,07 ^b	0,19 ±0,06 ^b		0,14 ±0,06 ^b		0,003

* mean ±standart deviation; PE= preeclampsia; SPE= superimposed preeclampsia; GH= gestational hypertension; CH= chronic hypertension; CP= control pregnancy; HAS= non-pregnant hypertensive women; N= non-pregnant normotensive control; GA= gestational age; BMI= body mass index; SBP and DBP= systolic and diastolic blood pressure; MAP= mean arterial pressure; Hct= hematocrit; Hb= hemoglobin; CR= serum creatinine; UA= uric acid; P/C 24h= random urinary protein/creatinine ratio. Statistically significant differences are marked with paired index (letters or numbers) as follows: a X b; 1 X 2; A X B.

Table 2. Total, y⁺ and y^{+L} maximal capacity of L-arginine transport.

Groups	V _{max} (μmol/L de céls/h)*		
	Total	y ⁺	y ^{+L}
PE (n=39)	1325 ± 431	949 ± 356 ^b	351 ± 140
SPE (n=8)	1307 ± 358	918 ± 443	493 ± 247
GH (n=14)	1458 ± 591	879 ± 473 ^b	380 ± 189
CH (n=10)	1239 ± 295	906 ± 289	313 ± 83
CP (n=28)	1276 ± 382	894 ± 332 ^b	413 ± 186
HAS (n=20)	1443 ± 605	1082 ± 553	385 ± 205
N (n=18)	1607 ± 681	1344 ± 576 ^a	371 ± 185
p(Anova)	0.323	0.017	0.349

*mean±standart deviation; PE= preeclampsia; SPE= superimposed preeclampsia; GH= gestational hypertension; CH= chronic hypertension; CP= control pregnancy; HAS= non-pregnant hypertensive women; N= non-pregnant normotensive control. Statistically significant differences are marked with paired index letters.

Table 3. Total, y⁺ and y^{+L} half saturation constant of L-arginine transport.

Groups	k _m (μmol/L)*		
	Total	y ⁺	y ^{+L}
PE (n=39)	89.3 ± 44.9	99.9 ± 49.5	64.6 ± 44.4
SPE (n=8)	91.6 ± 37.1	120.1 ± 73.1	89.4 ± 58.2
GH (n=14)	81.1 ± 35.2	75.8 ± 47.7	41.6 ± 23
CH (n=10)	73.7 ± 30.8	84.2 ± 30.3	41.6 ± 26.9
CP (n=28)	95.6 ± 39.1	110.7 ± 56.3	87.7 ± 54.8
HAS (n=20)	93.9 ± 34	113.2 ± 52.4	64.9 ± 49.3
N (n=18)	85.5 ± 28.9	127.3 ± 78	56.7 ± 55.2
p(Anova)	0.728	0.155	0.026

*mean±standart deviation; PE= preeclampsia; SPE= superimposed preeclampsia; GH= gestational hypertension; CH= chronic hypertension; CP= control pregnancy; HAS= non-pregnant hypertensive women; N= non-pregnant normotensive control.

