

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

BIOMEDICINA

JOSILENE DE JESUS AZEVEDO FERREIRA

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ÓXIDO NÍTRICO
NA PRÉ-ECLÂMPSIA: ESTUDO PILOTO

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia de Fátima Lopes de Andrade

Coorientadora: Msc. Leda Maria Ferraz da Silva

Habilitação: Análises Clínicas

Niterói, RJ

2016

JOSILENE DE JESUS AZEVEDO FERREIRA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ÓXIDO NÍTRICO
NA PRÉ-ECLÂMPسيا: ESTUDO PILOTO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Biomedicina, para obtenção do título de Bacharel, apresentado à Universidade Federal Fluminense.

Área de Concentração: Análises Clínicas

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia de Fátima Lopes de Andrade

Coorientadora: Msc. Leda Maria Ferraz da Silva

Niterói, RJ

2016

JOSILENE DE JESUS AZEVEDO FERREIRA

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ÓXIDO NÍTRICO
NA PRÉ-ECLÂPSIA: ESTUDO PILOTO**

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação em Biomedicina, para obtenção
do título de Bacharel, apresentado à
Universidade Federal Fluminense.

Área de Concentração: Análises Clínicas.

Aprovada em 01 de abril de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Patrícia de Fátima Lopes de Andrade - UFF
Presidente

Profa. Dra. Hye Chung Kang - UFF
Titular

Prof. Dr. Enrico Mendes Saggioro - UFF
Titular

Msc. Fernanda Freitas Oliveira Cardoso - UFF
Suplente

Niterói

2016

Dedico a Deus, não só a concretização deste sonho, mas todas as realizações da minha vida. É o meu amor maior, autor da minha fé, Senhor de tudo em mim, meu guia e protetor.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela Sua presença constante ao longo desta caminhada. Ele foi o meu sustento, fortaleza, segurança, força e paz.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio e incentivo que contribuiu para minha formação.

A minha orientadora, Dra. Patrícia de Fátima Lopes de Andrade, e a minha coorientadora, Msc. Leda Maria Ferraz da Silva, pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho.

Ao Hospital Guilherme Álvaro, localizado no município de Santos (SP) onde as voluntárias do estudo foram recrutadas. Ao Prof. Francisco Lázaro Pereira de Souza da Faculdade de Medicina da Fundação Lusíada (Santos/SP) e suas alunas de iniciação científica que executaram o recrutamento, coleta e processamento das amostras de sangue.

Ao Laboratório Multidisciplinar de Apoio à Pesquisa em Nefrologia e Ciências Médicas (LAMAP), localizado no Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP), onde realizamos as dosagens de óxido nítrico.

Aos membros titulares e suplentes da banca pela disponibilidade e aceite em participar de minha defesa.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

A disfunção endotelial é um ponto central para a instauração do processo fisiopatológico da pré-eclâmpsia. No entanto, apesar desta doença representar uma das principais causas de morte materna no Brasil e no mundo, a sua etiologia ainda é pouco conhecida. Até o momento, nenhum marcador bioquímico teve valor clínico para a doença, mas decorrente da função reguladora da integridade endotelial, o óxido nítrico (NO[·]) tem sido considerado um bom candidato, já que alterações na sua concentração sérica podem promover lesões nas células endoteliais como as encontradas no processo fisiopatológico da pré-eclâmpsia. O objetivo do presente estudo foi avaliar as concentrações de NO[·] sérico na pré-eclâmpsia. Trata-se de estudo caso-controle de corte transversal, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (nº 886.163). Foram incluídas 56 voluntárias do Hospital Guilherme Álvaro (Santos, SP), pareadas pela idade e divididas em grupo pré-eclâmpsia (PE), constituído de puérperas com pré-eclâmpsia (n=17); grupo controle (C), constituído de puérperas sem comorbidades (n=21) e, grupo controle negativo (CN), com 18 mulheres não grávidas saudáveis. Depois de assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e preencher o questionário obstétrico, cada voluntária recebeu orientações dietéticas para o dia anterior a coleta de sangue venoso após jejum noturno de 12-14 h. Depois do processamento das amostras de sangue, o soro obtido foi fracionado em alíquotas e, em seguida, armazenado a -80°C para análise posterior. O NO[·] sérico foi mensurado por método indireto, denominado de reação de Griess, no qual o nitrato é reduzido à nitrito, em presença de vanádio. As análises estatísticas foram feitas usando o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, Chicago: EUA) versão 18.0. Não houve diferença significativa no valor médio de NOx sérico (p =0,122) entre mulheres do grupo PE (26,00 ± 19,25 µM) comparadas com os grupos C (20,03 ± 8,61 µM) e CN (17,36 ± 7,22 µM). Com isso, o presente estudo não encontrou relação entre o NO[·] e a pré-eclâmpsia, porém, vale ressaltar que o n avaliado foi pequeno, o que não permite concluir ainda que o NO[·] não seja um bom biomarcador da pré-eclâmpsia.

Palavras chaves: hipertensão; gestação; óxido nítrico; pré-eclâmpsia; disfunção endotelial.

ABSTRACT

Endothelial dysfunction is a central point for the establishment of the pathophysiological process of preeclampsia. However, despite the preeclampsia represent a major cause of maternal death in Brazil as well as in the world, its etiology is still unknown. To date, no biochemical marker has clinical value to the disease but due to the regulatory function of endothelial integrity, nitric oxide (NO[·]) has been considered a good candidate, since changes in its serum levels may promote lesions in endothelial cells just as found in the pathophysiological process of preeclampsia. The aim of this study was to evaluate serum NO[·] concentrations in preeclampsia. This is a case-control cross-section, approved by the Research Ethics Committee (n^o 886163). They included 56 volunteers of the Hospital Guilherme Álvaro (Santos, SP), matched by age and classified into pre-eclampsia group (PE), consisting of puerperal women (n = 17); control group (C), consisting of puerperal women without comorbidities (n = 21) and negative control group (CN), 18 non pregnant healthy women. After signing the consent form and filling the obstetrical questionnaire, each volunteer received dietary guidelines for the day before the collection of venous blood after an overnight fast of 12-14 h. After processing the blood samples, the serum obtained was fractionated into aliquots and then stored at -80 °C for later analysis. Serum NO[·] was measured by an indirect method, called Griess reaction, in which nitrate is reduced to nitrite, in the presence of vanadium. Statistical analyzes were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Chicago USA) version 18.0. There was no significant difference in the mean serum level of NO_x (p = 0.122) among women in the PE group (26.00 ± 19.25 μM) compared with C group (20.03 ± 8.61 μM) and CN (17, 36 ± 7.22 μM). Thus, the present study found no relationship between NO[·] and preeclampsia, however, it is noteworthy that the rated n was small, which does not yet conclude that the NO is not a good biomarker of preeclampsia.

Keywords: hypertension; gestation; nitric oxide; pre eclampsia; endothelial dysfunction.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Grupo controle composto por puérperas sem comorbidades
CN	Grupo controle negativo composto por mulheres não grávidas saudáveis
cNOS	Óxido nítrico síntase constitutiva
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
eNOS	Óxido nítrico síntase endotelial
EO	Estresse oxidativo
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GMPc	Guanosina monofostato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
HUAP	Hospital Universitário Antônio Pedro
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Óxido nítrico síntase indutível
LAMAP	Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa em Nefrologia e Ciências Médicas
NO[•]	Radical óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
NO_x	Metabólitos de óxido nítrico (nitrato + nitrito)
PE	Grupo de estudo composto por puérperas com pré-eclâmpsia
sGC	Guanilato ciclase solúvel
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFF	Universidade Federal Fluminense

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Tipos de NOS.....	17
Figura 2 -	Reações catalisadas pela NOS.....	18
Figura 3 -	Fisiopatologia da pré-eclâmpsia.....	20

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 -	Curva padrão de nitrato.....	26
Gráfico 2 -	Comparação entre as concentrações de NOx nos grupos estudados.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Registro de idade das voluntárias do estudo (n=52).....	26
Tabela 2 - Concentração sérica de NOx na população.....	27

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.	PRÉ-ECLÂMPZIA.....	13
1.2.	ÓXIDO NÍTRICO.....	16
1.3.	PRÉ-ECLÂMPZIA E ÓXIDO NÍTRICO.....	19
2.	OBJETIVO.....	21
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2.	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	22
3.	METODOLOGIA.....	22
3.1.	LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	22
3.2.	TIPO DE PESQUISA.....	22
3.3.	AMOSTRA.....	22
3.3.1.	Crítérios de Inclusão e Exclusão.....	23
3.4.	COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	24
3.5.	COLETA DE SANGUE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS	24
3.6.	DETECÇÃO INDIRETA DE ÓXIDO NÍTRICO SÉRICO.....	24
3.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
4.	RESULTADOS.....	25
5.	DISCUSSÃO.....	28
6.	CONCLUSÃO.....	29
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
	ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	35
	APÊNDICES.....	36
	APÊNDICE 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	36
	APÊNDICE 2 - Questionário Obstétrico.....	38
	APÊNDICE 3 - Orientações Gerais e Dietéticas para a Coleta de Sangue.....	40

1. INTRODUÇÃO

1.1. PRÉ-ECLÂMPسيا

A pré-eclâmpsia é definida como distúrbio multissistêmico específico do ciclo gestatório patológico humano (REIS et al., 2003). Nesta condição, observam-se alterações fisiológicas inadequadas capazes de favorecer significativamente o estabelecimento de problemas materno-fetais potencialmente graves (PEREIRA, MONTENEGRO & RESENDE FILHO, 2008). Também caracterizada como gestação hipertensiva de alto risco, essa afecção representa a complicação médica de maior relevância durante o período gravídico-puerperal (NASCIMENTO, BOCARDI & ROSA, 2015). O termo toxemia gravídica abrange a fase pré-eclâmptica, referente ao momento inicial de mudanças funcionais, bem como o seu desfecho mais grave, intitulado de eclâmpsia (REZENDE FILHO & MONTENEGRO, 2008).

As alterações fisiológicas decorrentes do processo gestacional fornecem viabilidade ao desenvolvimento fetal a partir das adaptações do organismo materno. Em sua maioria, tal evolução ocorre sem intercorrências, mas, em determinados casos, verifica-se o surgimento de maiores irregularidades (SANTOS, CAMPOS & DUARTE, 2014). Esta minoria constitui o grupo chamado de gestantes de alto risco, representado por 15% das gestações (GOUVEIA & LOPES, 2004) e caracterizado através da observação do perfil sócio-demográfico das mulheres, da fisiologia obstétrica e dos processos patológicos próprios e decorrentes da gravidez (BRASIL, 2001). Tal conceituação identifica o grau de vulnerabilidade nos períodos de gestação, parto, puerpério e vida da criança em seu primeiro ano (GOMES et al., 2001).

O recente manual técnico sobre gestação de alto risco do Ministério da Saúde aborda aspectos importantes das mais frequentes comorbidades obstétricas, dando destaque as síndromes hipertensivas da gravidez (BRASIL, 2012). Estas se diferenciam não só pela gravidade e efeitos sobre o feto, como também quanto à prevalência na população (OLIVEIRA et al., 2006). Assim, a hipertensão arterial é a complicação médica mais comum da gravidez

(SIQUEIRA et al., 2011), presente de 2% a 8% das gestações em países desenvolvidos e pode chegar a 30% no Brasil (MORAIS et al., 2013). Para a epidemiologia, esta prevalência constitui um indicador da realidade sócio-econômica de um país e da qualidade de vida de sua população (MOARES, 2008).

Conceitua-se como hipertensão arterial, a entidade clínica multifatorial caracterizada pela presença de níveis tensionais permanentemente elevados acima dos limites de normalidade associados a alterações metabólicas e hormonais. Essa condição manifesta-se quando o nível da pressão arterial sistólica for ≥ 140 mmHg e pressão arterial diastólica por ≥ 90 mmHg, em duas aferições (KOHLMANN JR. et al., 1999).

A pré-eclâmpsia leve, pré-eclâmpsia grave e a eclâmpsia, nesta sequência, representam de forma crescente a gravidade da toxemia gravídica (ZIEGEL & CRANLEY, 1985). A gestante pode adentrar em qualquer fase do processo patológico, pois a doença não progride linearmente no sentido de moléstia ligeira para grave. Com isso, algumas mulheres podem desenvolver, de forma repentina, pré-eclâmpsia grave ou eclâmpsia (OMS, 2005). A pré-eclâmpsia é uma das principais causas de morte materna no Brasil e a terceira, no mundo (SOUZA et al., 2006), comprometendo de 2 a 30% das gestações (SPADA et al., 2005). Estima-se a incidência de eclâmpsia em 1 caso a cada 330 partos, nos países desenvolvidos, enquanto no Brasil, ocorre em aproximadamente em 1% das gestações (NOVO & GIANINI, 2010).

A pré-eclâmpsia é caracterizado principalmente pelo surgimento do quadro de hipertensão arterial associada a proteinúria em mulheres normotensas a partir da 20^a semana gestacional, com maior frequência no seu último trimestre (SUS-BH, 2010). Além do comprometimento encefálico e cardíaco, alterações causadas pela hipertensão durante a gravidez podem reduzir o fluxo útero-placentário, restringindo o crescimento uterino e causando morte fetal (TADESCO et al., 2004). A proteinúria compreende a excreção urinária de proteínas com valor maior que 300 mg de proteínas em urina de 24h na ausência de infecção e pode refletir possíveis alterações na função

renal (COELHO et al., 2004). Em casos especiais, como na moléstia trofoblástica e na hidropsia fetal não imune, a síndrome pode se manifestar antes da 20ª semana, trazendo consigo um prognóstico mais preocupante para mãe seu concepto (NAKAOKA et al., 2013).

Muitos fatores influenciam significativamente o desenvolvimento da pré-eclâmpsia. Considera-se a idade materna um dos fatores mais pertinentes, já que, no Brasil, aproximadamente 21,6% dos nascidos vivos são de mulheres com menos de 20 anos. Para as adolescentes, estes riscos têm sido largamente explicados por características socioeconômicas desfavoráveis, enquanto fatores biológicos relacionados à idade têm sido relacionados ao aumento do risco para as mulheres mais velhas (SANTOS et al., 2009). Sabendo que cerca de 19,2% de mulheres apresentam sobrepeso no pré-natal, a obesidade se relaciona com a pré-eclâmpsia (ADILHA et al., 2007), na medida que o risco de desenvolvê-la aumenta quanto maior for o índice de massa corporal (IMC) (AMARAL & PARAÇOLI, 2011). A pré-eclâmpsia acomete com mais frequência mulheres nulíparas. Nesse caso, a doença é geralmente leve, surgindo próximo ao termo ou ao período intraparto (75%) e apresenta um risco pequeno quanto ao prognóstico desfavorável da gestação. Entretanto, a frequência e a gravidade da doença são maiores nas gestações múltiplas, na hipertensão crônica, na gestação anterior com pré-eclâmpsia, na diabetes mellitus e nas trombofilias preexistentes (SOUZA et al., 2006).

Os vários exames laboratoriais relacionados com o valor prognóstico nas síndromes hipertensivas, tais como a proteinúria, contagem de plaquetas, creatinina plasmática, bilirrubinas, transaminases hepáticas e a desidrogenase láctica, quando adicionados aos parâmetros clínicos permitem uma espécie de estadiamento da moléstia. Dentre estas provas laboratoriais, reserva-se especial atenção a proteinúria, pois a sua positividade é selo do diagnóstico da pré-eclâmpsia (COELHO et al., 2004).

A pré-eclâmpsia é caracterizada pelo intenso estado inflamatório e antiangiogênico. Com relação a etiopatogenia, o desenvolvimento da pré-eclâmpsia pode ser dividido em três fases. A primeira fase é representada por

uma quebra de tolerância imunológica, na qual a interação do trofoblasto com os leucócitos deciduais gera, entre outras alterações, inadequada produção de citocinas e quimiocinas que tornam a interface materno-fetal imprópria para o desenvolvimento normal da gravidez. Na segunda fase de desenvolvimento da doença, o trofoblasto extraviloso não desempenha adequadamente suas funções de invasão e remodelamento dos vasos uterinos. A quebra de tolerância materno-placentária pode levar à placentação deficiente, resposta inflamatória e, conseqüentemente, à pré-eclâmpsia. A invasão trofoblástica deficiente implica mau controle da oxigenação do espaço interviloso na fase inicial da gravidez e na persistência das características primárias das artérias uterinas espiraladas, que mantêm sua elevada resistência, promovendo a síntese exagerada de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). Estes radicais livres levam a resposta inflamatória e a danos no tecido placentário (OLIVEIRA, KARUMANCHI & SASS, 2010).

1.2. ÓXIDO NÍTRICO

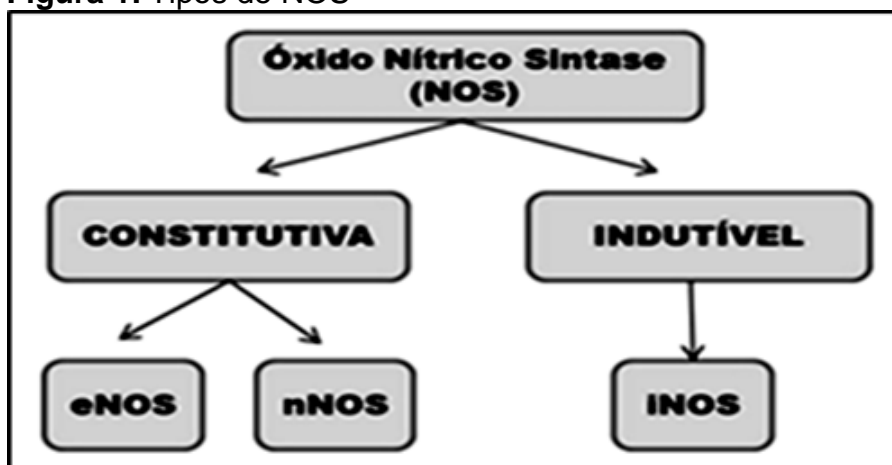
Em seu estado puro, sob condições normais de temperatura e pressão, o óxido nítrico (NO^\cdot) é uma molécula neutra que se apresenta como um gás incolor e estável. O moderado grau de solubilidade na água permite ao NO^\cdot adentrar em ambientes lipofílicos quando submetido a sistemas biológicos, ainda que sua concentração *in vivo* seja baixa e a meia-vida, curta. Além disso, a natureza radicalar lhe confere um caráter altamente reativo frente a outras moléculas paramagnéticas, tais como o oxigênio molecular e o ânion superóxido, proporcionando importância tóxica e fisiológica à molécula (BARRETO & CORREIA, 2005).

Considera-se este óxido, um poluente atmosférico produzido por meio da exaustão de carros e de procedimentos industriais. Sua liberação no ambiente é influenciada pelo ciclo do nitrogênio através de vias biogênicas resultantes, inclusive, da ação de bactérias (ARAUJO, 2011). Em virtude da atuação junto a elementos sanguíneos, inicialmente, o NO^\cdot foi chamado de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). Hoje, múltiplos

mecanismos fisiopatológicos se agregaram aos conceitos elementares da molécula, incorporando teorias acerca de sua intervenção no estado imunológico e na promoção de impulsos nervosos (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

Expressa em diversas células, a família de metaloenzimas com grupamento heme, designada como óxido nítrico sintase (NOS), é encarregada da biossíntese do NO^{\cdot} . As três isoformas existentes (fig. 1) possuem grande homologia estrutural e são funcionais somente como estruturas diméricas por meio da interação entre os domínios redutor e oxidante, promovida pelo sítio de ligação do íon cálcio à calmodulina. A enzima com perfil indutível difere das formas constitutivas segundo o peso molecular, modo de ativação e quanto à capacidade de síntese de NO^{\cdot} . À vista disso, a NOS neuronal (nNOS ou NO-I) e a NOS endotelial (eNOS ou NO-III) são formas constitutivas e dependentes de calmodulina, sendo responsáveis pela mediação da plasticidade sináptica e pela prevenção da agregação plaquetária, respectivamente. Enquanto a NOS indutível (iNOS ou NO-II) participa da resposta antipatogênica e antitumoral do organismo, consoante a estimulação por macrófagos (BRUCKDORFER, 2005).

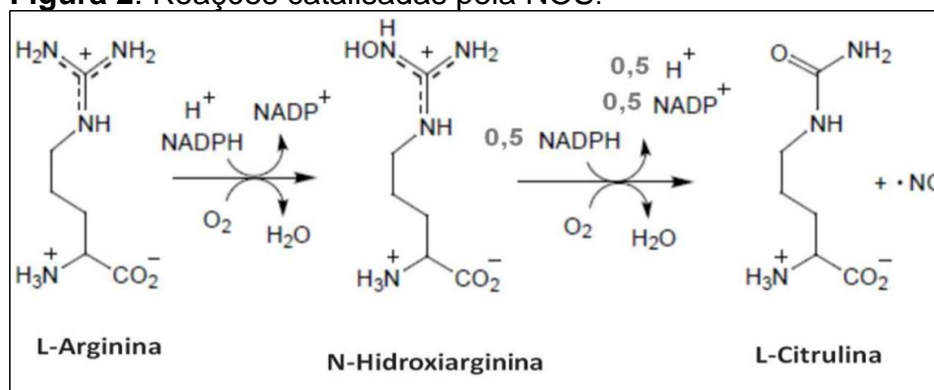
Figura 1: Tipos de NOS



Fonte: Modificado de Dusse et al., 2003. eNOS: NOS endotelial; nNOS: NOS neuronal; iNOS: NOS indutível.

Subdividida em duas etapas, a reação global de biossíntese endógena de NO^\cdot , catalisada pela NOS, promove a oxidação aeróbica da L-arginina à L-citrulina (fig. 2). Muitas moléculas desempenham funções essenciais nesta reação, tais como o oxigênio molecular, além de diversos cofatores e substratos. Dependendo do meio, o NO^\cdot pode sofrer eventos de oxidação ou redução (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002). Assim, quando oxidada, esta molécula também origina nitratos e nitritos, compostos capazes de regenerar outras moléculas de NO^\cdot à medida que sofrem redução. Essa via nitrato-nitrito-NO evidencia-se em condições de baixa disponibilidade de oxigênio ou quando a atividade enzimática da NOS se encontra prejudicada (WEITZBERG, HEZEL & LUNDBERG, 2010).

Figura 2: Reações catalisadas pela NOS.



Fonte: Modificado de Groves & Wang, 2000.

No estado de estresse oxidativo (EO), observa-se um desequilíbrio entre as reações de óxido-redução no organismo, devido ao predomínio de elementos pró-oxidantes em detrimento do sistema antioxidante. O resultado é a quebra homeostásica celular pela formação de compostos tóxicos que podem causar danos a proteínas e ao DNA. No caso do NO^\cdot , sabe-se que sua estabilidade ocorre pela reação com outros componentes de mesma natureza radicalar ou ao complexar-se com metais de transição, com a finalidade de gerar ERNs. Nas reações descritas, o NO^\cdot promove a formação de radicais livres como ânion superóxido, os radicais hidroxila e o peroxinitrito, metabólitos com potencial extremamente deletério (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Tais radicais são gerados naturalmente por organelas citoplasmáticas durante importantes processos metabólicos, como na ativação do sistema imunológico e na desintoxicação de drogas. Em contrapartida, quando os radicais livres estão em excesso, o sistema antioxidante controla os efeitos nocivos para manter o equilíbrio entre as reações de óxido-redução através de enzimas e de compostos ingeridos pela dieta. Este equilíbrio, portanto, é importante para a manutenção da integridade celular (SCHNEIDERS & OLIVEIRA, 2004).

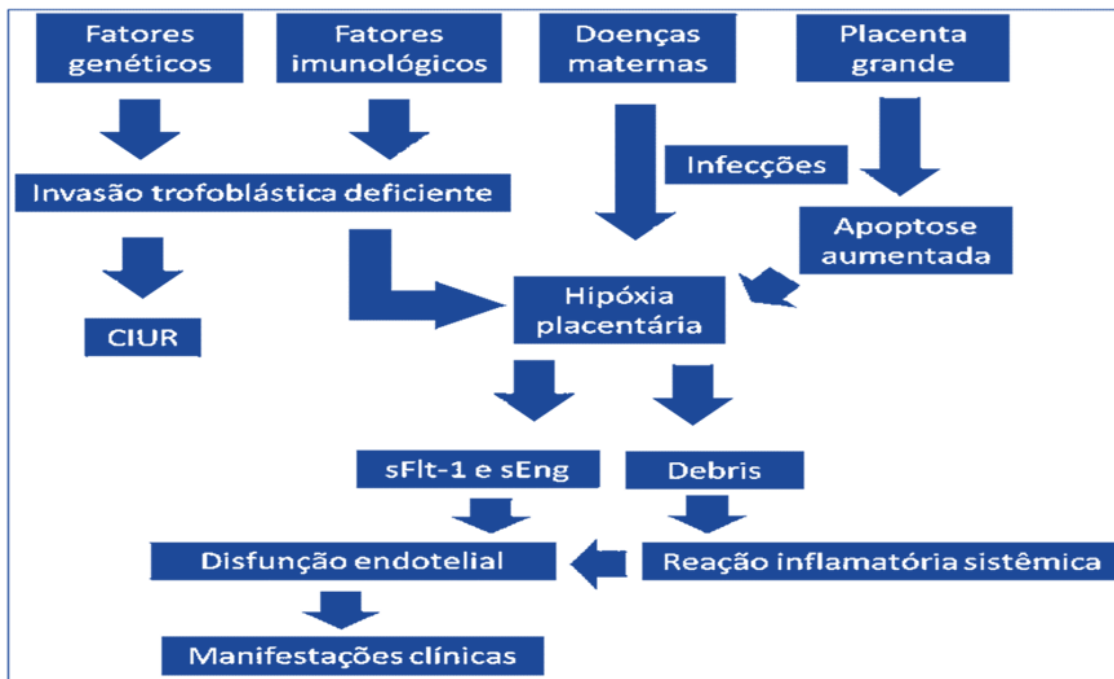
O NO[•] tem um extenso papel nas diversas manifestações fisiopatológicas do organismo. Desse modo, em circunstâncias inflamatórias, o sistema imunológico pode produzir altas concentrações de NO[•] através da enzima iNOS, acarretando danos aos ciclos metabólicos das células afetadas. A respeito do músculo liso, ao ligar-se ao grupamento férrico da enzima sGC (guanilato ciclase solúvel), o NO[•] converte moléculas de GTP (guanosina trifosfato) em GMPc (guanosina monofosfato cíclico) com intuito de iniciar seu efeito vasorelaxante (KNOBEL, 1996). Semelhantemente, a ativação plaquetária é inibida pela redução de íons cálcio livre, após o aumento de GMPc. Já no sistema nervoso central e periférico, o influxo de íons cálcio ativa a nNOS, formando NO[•] que, atuando como neurotransmissor, medeia a capacidade de modulação e adaptação das sinapses para a neurotransmissão do impulso nervoso, além de facilitar a liberação de outros neurotransmissores e hormônios (BRUCKDORFER, 2005).

1.3. PRÉ-ECLÂMPسيا E ÓXIDO NÍTRICO

A origem dos processos fisiopatológicos da pré-eclâmpسيا é multifatorial, mas ao longo do tempo, muitos estudos destacaram a hipótese da participação do NO[•] no desenvolvimento desta síndrome. Esta molécula é o principal componente responsável pela integridade endotelial dos vasos sanguíneos. Por conseguinte, mecanismos que alteram as concentrações de NO[•] estão intimamente correlacionados com a disfunção das células endoteliais, sendo esta condição, o vínculo fundamental que liga todos os fatores promotores do

desenvolvimento fisiopatológico da pré-eclâmpsia com suas manifestações sistêmicas (fig. 3) (CORRÊA JÚNIOR, AGUIAR & CORRÊA, 2009).

Figura 3: Fisiopatologia da pré-eclâmpsia



Fonte: Modificado Corrêa Jr., Aguiar & Corrêa, 2009.

Segundo Cavalli et al. (2009), durante a gravidez normal, observa-se um aumento nos níveis de NO[•] pela atividade da eNOS. Entretanto, não há consenso, na literatura, quanto a variação da concentração sérica de NO[•] entre em gestantes normais e com pré-eclâmpsia. De acordo com Boccardo et al. (1996), não há diferença entre a síntese de NO[•] entre essas pacientes. Mas outros autores afirmam que a concentração de NO[•] sofre modificações ao longo do período gravídico na pré-eclâmpsia. Recentemente, Adu-Bonsaffoh et al. (2015) relataram níveis elevados de NO[•] em gestantes com pré-eclâmpsia quando comparadas com gestantes normais e também com mulheres não grávidas.

Na gravidez, a vasodilatação sistêmica e a diminuição da sensibilidade endotelial são mecanismos normais de adaptação materna promovidos pelo NO[•]. A consequente perfusão placentária decorrente desses processos permite

que o feto tenha sua nutrição realizada de forma adequada. Na pré-eclâmpsia, a lesão endotelial encontrada pode surgir tanto da liberação incorreta de fatores agressivos pela placenta quanto pelo o excesso de componentes do sistema renina-angiotensina (CAVALLI et al., 2009).

A interferência genética é um dos mecanismos que sugere a influência da produção de NO[·] no estabelecimento da pré-eclâmpsia. À vista disso, quando estudos buscaram verificar a associação entre genes maternos no desenvolvimento da doença, detectaram mutações na posição Glu298Asp do gene da eNOS, indicando que há um aumento na resistência vascular periférica pela diminuição da síntese de NO[·] (OLIVEIRA et al., 2015).

Na fisiopatologia da pré-eclâmpsia, as alterações envolvendo o processo de invasão trofoblástica promove o inapropriado suprimento sanguíneo do útero e o EO do tecido placentário (OLIVEIRA, KARUMANCHI & SASS, 2010). Este estresse resulta da implantação da quebra homeostásica devido, também, à baixa atividade de NO[·] e a diminuição de seu precursor levando ao desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e os mecanismos antioxidantes (TEIXEIRA, 2006).

A pré-eclâmpsia continua sendo uma síndrome que leva a graves repercussões materno-fetais, e pouco se conhece a respeito da sua etiologia (SOUZA, 2006). Diante do exposto, verifica-se que a participação do NO[·] na quebra da integridade tissular é de grande importância na etiopatogênese da pré-eclâmpsia. O presente estudo busca avaliar as concentrações séricas de NO[·] como possível marcador biológico a fim de fornecer novos parâmetros laboratoriais de diagnóstico e prognóstico da pré-eclâmpsia.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar as concentrações de NO[·] sérico na pré-eclâmpsia.

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

Dosar a concentração sérica de NO⁻ em puérperas com diagnóstico de pré-eclâmpsia, comparando internamente com puérperas sem comorbidades e, externamente, com mulheres não grávidas.

3. METODOLOGIA

3.1. LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo caso-controle incluiu gestantes do Hospital Guilherme Álvaro, localizado no município de Santos (SP). Foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Lusíada sob número 886.163 (Anexo).

As dosagens de NO⁻ nas amostras sanguíneas coletadas das voluntárias do estudo foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa em Nefrologia e Ciências Médicas (LAMAP) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense (UFF), localizado no Hospital Universitário Antonio Pedro (HUAP) em Niterói (RJ).

3.2. TIPO DE PESQUISA

Trata-se de um estudo observacional de corte transversal com grupo de comparação.

3.3. AMOSTRA

O tamanho amostral do estudo original foi estimado em 50 puérperas com diagnóstico confirmado de pré-eclâmpsia, seguindo técnica padrão, no pós-parto imediato até o segundo dia puerpério. O segmento controle constituiu-se de 50 puérperas sem comorbidades (pós-parto imediato até o segundo dia de puerpério) e, no controle negativo, 50 mulheres não grávidas.

3.3.1. Critérios de Inclusão e Exclusão

Critérios de Inclusão

Grupo de estudo (PE): puérperas que deram à luz a recém-nascido único, com o diagnóstico na gestação ou puerpério imediato de pré-eclâmpsia, definido por pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg, em duas aferições distintas segundo técnica adequada, associado a proteinúria significativa avaliada através da pesquisa em fita de proteinúria reagente com o valor de uma cruz ou mais e/ou proteinúria de 24 h \geq a 300 mg. Os critérios citados foram definidos pelo NHBPEP (*National High Blood Pressure Education Program*) em 2000.

Grupo controle (C): puérperas que, por via vaginal, deram à luz a recém-nascido único, vivo, a termo, na ausência de hipertensão e/ou outras comorbidades.

Grupo controle negativo (CN): mulheres não grávidas saudáveis. Para considerar mulheres não grávidas como sendo saudáveis, foram incluídas no grupo CN apenas as mulheres que não estavam inseridas dentro dos seguintes grupos: fumantes, lactantes, obesas (IMC ≥ 30 Kg/m²), hipertensas (pressão sanguínea $\geq 140/90$ mmHg) ou usando drogas anti-hipertensivas, diabéticas usando insulina ou drogas hipoglicemiantes, doença cardiovascular, câncer, diarreia, mulheres em uso de medicação para anormalidades lipídicas, aspirina, nitritos, esteroides, diuréticos, betabloqueadores, digitálicos, bloqueadores de canais de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina e drogas para distúrbios da tireoide. Além disso, foram excluídas mulheres não saudáveis com base na história clínica e nos exames sanguíneos como hemograma, pesquisa de auto-anticorpos positiva, perfil lipídico (triglicérides ≥ 150 mg/dL, colesterol total ≥ 200 mg/dL, HDL-c < 50 mg/dL, LDL-c > 130 mg/dL), creatinina $> 1,4$ mg/dL e glicemia de jejum ≥ 110 mg/dL.

Critérios de Exclusão

Somente para o grupo controle (C) foi aplicado o critério de exclusão. Portanto, foram excluídas puérperas que apresentam as seguintes condições:

colagenoses, tabagismo, gestação gemelar, malformações fetais, óbito fetal cefálico e diabetes.

3.4. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Apêndice 1), o examinador aplicou um questionário obstétrico pré-estabelecido (Apêndice 2). Em seguida, a voluntária recebeu as orientações dietéticas para o dia anterior à coleta de sangue (Apêndice 3).

3.5. COLETA DE SANGUE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

A coleta de sangue venoso foi realizada após 12-14 h de jejum noturno. Depois de processar o sangue, o soro obtido foi fracionado em alíquotas com volume mínimo de 500 µL cada e mantidos em freezer -80°C em laboratório até o momento da detecção do nível sérico de NO[•]. No transporte das amostras de Santos para Niterói as amostras foram mantidas em gelo seco.

3.6. DETECÇÃO INDIRETA DE ÓXIDO NÍTRICO SÉRICO

A detecção do NO[•] sérico foi realizada através da reação modificada de Griess, no qual o nitrato é reduzido a nitrito, em presença de vanádio. Essa reação permite a mensuração do NO[•] total (nitrato + nitrito = NO_x) presente no sangue periférico (MIRANDA, ESPEY & WINK, 2001; GHASEMI, ZAHEDIASL & AZIZI, 2010).

As amostras de soro foram desproteinizadas usando sulfato de zinco (15 g/L) e centrifugadas a 10.000 x g por 10 min a 4°C, e o sobrenadante recuperado. Cinquenta microlitros de amostra desproteinizada foram aplicados em cada poço de microplaca (96 poços) de fundo chato (Greiner, USA). Subsequentemente, 50 µL de cloreto de vanádio III (4 g/50 mL em HCl 1 N), foram adicionados a cada poço da placa e, imediatamente, adicionou-se 50 µL do reagente de Griess [25 µL SULFA (2% em HCl 5%) e 25 µL de NED (0,1%)]. Após incubação de 30 a 45 min a 37°C a absorbância de cada amostra a 540

nm foi determinada em Espectrofotômetro de Microplacas (Spectramax Molecular Devices ®, USA). A concentração de NOx no soro foi determinada pelo estabelecimento de curva padrão de nitrato de sódio de 0 a 100 µM.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, Chicago: EUA) versão 18.0. Para análise das frequências foi utilizado o teste de Fisher; para comparação entre os três grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. A comparação das três amostras entre si foi realizada usando o pós-teste de Dunn. Nível de confiança: 95%.

4. RESULTADOS

Até o momento, para o presente estudo piloto, concordaram e assinaram o TCLE 56 voluntárias: 17 puérperas com pré-eclâmpsia (PE), 21 puérperas sem comorbidades (C) e 18 não grávidas saudáveis (CN).

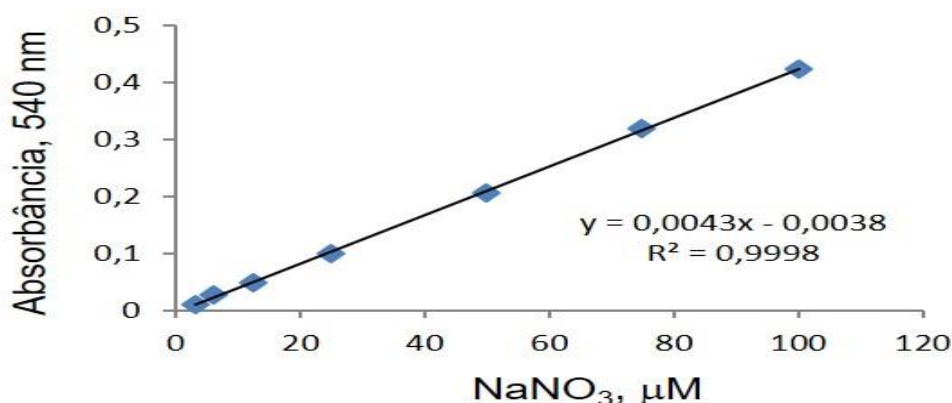
Entre as 56 voluntárias, verificou-se a ausência de registro de idade em duas do grupo C e 2 do grupo PE. Assim, a média de idade foi calculada a partir das 52 voluntárias restantes, sendo de $29,4 \pm 6,1$ anos no grupo PE, de $25,8 \pm 7,1$ anos no grupo C e, no grupo CN foi de $23,7 \pm 4,6$ anos (Tabela 1). A idade mínima tanto no grupo PE quanto no grupo C foi de 18 anos, e a máxima de 37 e 39 anos, respectivamente. No grupo CN a idade mínima foi de 20 anos e a máxima de 40 anos (Tabela 1).

Tabela 1: Registro de idade das voluntárias do estudo (n=52)

N total = 52	Idade (anos)		
	C (n=19)	PE (n=15)	CN (n=18)
Média ± dp	25,84 ± 7,05	29,40 ± 6,05	23,72 ± 4,50
Mínimo	18	18	20
Máximo	39	37	40

Nota: C: grupo controle composto por puérperas sem comorbidades; PE: grupo de estudo com pré-eclâmpsia; CN: grupo controle negativo composto por mulheres não grávidas saudáveis.

As concentrações séricas de NOx foram obtidas após comparar os valores de absorvância usando metodologia descrita por Ghasemi et al. (2010) validada pelo grupo com a curva padrão de nitrato mostrada no gráfico1.

Gráfico 1: Curva padrão de nitrato.

Nota: A curva foi realizada com concentrações conhecidas de nitrato de sódio (0 a 100 µM) usando o método de Griess/vanádio.

A dosagem de NOx foi realizada em triplicata para todas as amostras. O valor médio de NOx obtido após orientação dietética seguida de jejum noturno de 12-14 h foi de 20,03 ± 8,61 µM para o grupo C; 26,00 ± 19,25 µM para o grupo PE, e de 17,36 ± 7,22 µM para o grupo CN. Os valores mínimo e máximo de NOx no grupo C foram 9,61 a 46,81 µM, respectivamente. No grupo PE, o

valor mínimo de NOx foi de 12,52 μM e o máximo, de 92,80 μM . Já no grupo CN apresentaram NOx mínimo de 9,87 μM e máximo de 34,55 μM (Tabela 2).

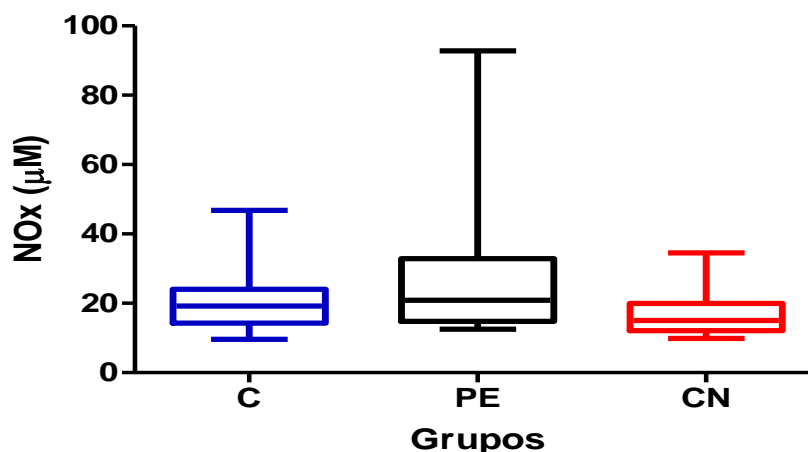
Tabela 2: Concentração sérica de NOx na população

N total = 56	NOx (μM)		
	C (n=21)	PE (n=17)	CN (n=18)
Média \pm dp	20,03 \pm 8,61	26,00 \pm 19,25	17,36 \pm 7,22
Mínimo	9,61	12,52	9,87
Máximo	46,81	92,80	34,55

Nota: NOx: concentração de nitrato e nitrito circulantes que corresponde ao nível de NO^- ; C: grupo controle composto por puérperas sem comorbidades; PE: grupo de estudo com pré-eclâmpsia; CN: grupo controle negativo composto por mulheres não grávidas saudáveis.

No gráfico 2, verificamos que não houve diferença significativa entre as dosagens séricas de NOx entre os grupos C, PE e CN ($p = 0,122$).

Gráfico 2: Comparação entre as concentrações de NOx nos grupos estudados



Nota: análise não paramétrica entre os grupos mostra que não houve diferença significativa das concentrações de NOx ($p = 0,122$) entre todos os grupos (C, PE e CN). NOx: concentração de nitrato e nitrito circulantes que corresponde ao nível de NO^- ; C: grupo controle composto por puérperas sem comorbidades; PE: grupo de estudo com pré-eclâmpsia; CN: grupo controle negativo composto por mulheres não grávidas saudáveis

5. DISCUSSÃO

O NO[•] é o principal regulador do tônus vascular (CAVALLI et al., 2009), e de maneira geral, durante uma gestação normal seu aumento é observado pelo aumento da atividade da eNOs (ANUMBA et al., 1999). Especificamente na placenta, a atividade da eNOS é importante, uma vez que o NO[•] sintetizado mantém localmente a resistência vascular baixa, além de atenuar a ação dos vasoconstritores, fundamental ao desenvolvimento do concepto (BAYLIS et al., 1998).

A concentração de NO[•] *in vivo* é considerada baixa e sua meia-vida, extremamente curta (cerca de 4 a 6 s no plasma e de 10 a 60 s nos tecidos) (TEIXEIRA, 2006). Estima-se que a atividade do eNOS seja responsável por 70% dos níveis sistêmicos de NO[•], além disso, os nitritos/nitratos circulantes funcionam como reservatório de NO[•] na circulação, pois em condições de pH baixo ou baixas pressões de oxigênio são convertidos a NO[•] (KLEINBONGARD et al., 2003). Entretanto, a concentração plasmática dos nitritos/nitratos pode sofrer alterações decorrentes principalmente da ingestão de alimentos ricos em nitrato/nitrito (LUNDBERG, WEITZBERG & GLADWIN, 2008).

Na literatura, não há consenso quanto à variação da concentração sérica de NO[•] entre em gestantes normais e com pré-eclâmpsia. Os valores de NOx encontrados no presente estudo estão de acordo com os dados de Conrad et al (1999), Lyall et al. (1995), Davidge et al. (1996), Hata et al. (1999), e Boccardo et al. (1996) que também não encontraram diferença significativa entre gestantes com pré-eclâmpsia quando comparadas com gestantes normais. Acauan Filho (2002) encontrou níveis de NO[•] discretamente mais elevados em gestantes nulíparas com pré-eclâmpsia, enquanto Adu-Bonsaffoh et al. (2015) relataram níveis bem elevados de NO[•] em relação a gestantes normais e não-gestantes. No estudo de Adu-Bonsaffoh et al. (2015), as coletas foram realizadas a partir da 26^a semana de gestação e antes do parto, como a maioria das pesquisas.

No presente estudo, a coleta foi realizada após o parto e até o segundo dia de puerpério. Portanto, leva-se em conta possíveis alterações na concentração sérica de NO[•] decorrentes da retirada da placenta pós-parto, pois este órgão é produz NO[•] placentário através da atividade enzimática da eNOS (TEIXEIRA, 2006), e sua remoção seria capaz favorecer a diminuição da concentração sérica de NO[•] analisada. Tal hipótese ainda precisa ser melhor compreendida por meio do estudo contínuo dessas concentrações, no qual o recrutamento de mais pacientes é de suma importância e poderia esclarecer os padrões verificados até o momento.

Com relação aos valores de desvio-padrão do NOx mostrados no gráfico 2, no grupo PE uma paciente apresentou NOx de 92,80 µM, valor bem acima da média do grupo, o que levou a um valor de desvio padrão elevado. Para minimizar o efeito da dieta na concentração de NOx circulante, foi entregue a cada participante do estudo orientações dietéticas dos alimentos ricos em nitrato a serem evitados no dia anterior à coleta, conforme já explicitado por muitos autores (NOBUNAGA et al., 1996; BAYLIS & VALLANCE, 1998; RANTA et al., 1999). As coletas foram realizadas após jejum noturno de 12-14 h de forma a garantir que o nitrato e nitrito circulantes estariam diretamente relacionados à produção endógena de NO[•]. Não podemos afirmar que todas as pacientes seguiram as orientações sugeridas, e isto justificaria os valores elevados de NOx (PATHAK et al., 1999; SHAAMASH et al., 2000). Todavia, isto é somente uma especulação.

6. CONCLUSÃO

Tradicionalmente, a predição da pré-eclâmpsia tem sido baseada na detecção de fatores de risco da gestante, bem como a avaliação da pressão sanguínea e proteinúria. Entretanto, várias gestantes que não apresentam tais fatores de risco também desenvolvem pré-eclâmpsia, o que torna necessária a obtenção de marcadores bioquímicos que podem predizer tal condição (CAVALLI et al., 2009). A produção de NO[•] é um importante elemento na manutenção da fisiologia endotelial e seu comprometimento é definitivo para o

surgimento das manifestações clínicas da pré-eclâmpsia (BRANDÃO et al., 2011).

A importância da predição de quais mulheres desenvolverão pré-eclâmpsia é claramente necessária, pois direcionaria cuidados médicos especiais e medidas preventivas que poderiam prolongar a gestação e diminuir os riscos maternos- fetais. Até o momento, nenhum marcador tem valor clínico, mas o NO[•] tem sido considerado um bom candidato (CAVALLI et al., 2009). Entretanto, no presente estudo não encontramos relação entre o NO[•] e a pré-eclâmpsia, porém o n avaliado ainda é pequeno, o que não permite concluir ainda que ele não seja um bom marcador bioquímico da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADILHA, P. C. et al. Associação entre o estado nutricional pré-gestacional e a predição do risco de intercorrências gestacionais. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 29, n. 10, p. 511-518, 2007.
- ADU-BONSAFFOH, K. et al. Nitric oxide dysregulation in the pathogenesis of preeclampsia among Ghanaian women. *Integrated Blood Pressure Control*, v. 8, 2015.
- ACAUAN FILHO, B. J. Metabólitos plasmáticos do óxido nítrico em primigestas normais e com síndrome de pré-eclâmpsia. Dissertação de Mestrado, Faculdade, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil, 2002.
- ANUMBA, D. O. et al. Nitric oxide activity in the peripheral vasculature during normotensive and preeclamptic pregnancy. *Am J Physiol*, v. 277, n. 2 Pt 2, p. 848-54, 1999.
- AMARAL, W. T.; PARAÇOLI, J. C. Fatores de risco relacionados à pré-eclâmpsia. *Com Ciências Saúde*, v. 22, n. 1, p. 161-168, 2011.
- BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Quim Nova*, v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005.
- BAYLIS, C. et al. Recent insights into the roles of nitric oxide and renin-angiotensin in the pathophysiology of preeclamptic pregnancy. *Seminars in Nephrology*, v. 18, n. 2, p. 208-30, 1998.
- BOCCARDO, P. et al. Systemic and fetal-maternal nitric oxid synthesis in normal pregnancy and preeclampsia. *Br J Obstet Gynacoecol*, v. 103, p. 879-86, 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Gestação de Alto Risco. Manual Técnico. 5ª edição. Brasília, DF, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Parto, aborto e puerpério: assistência humanizada à mulher. Brasília, DF, 2001.
- BRANDÃO A. H. F. et al. O endotélio vascular e seu papel-chave na fisiopatologia da pré-eclâmpsia. *Femina*, v. 39, n. 4, 2011.
- BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. *Elsevier*, v. 26, p. 3-31, 2005.
- CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cir Bras*, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.

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*, v. 277, n. 1 Pt 2, p. 48-57, 1999.

COELHO, T. M. et al. Proteinúria nas síndromes hipertensivas da gestação: prognóstico materno e perinatal. *Rev Assoc Med Bras*, v. 50, n. 2, p. 207-213, 2004.

CORRÊA JR., M. D.; AGUIAR, R. A. L. P.; CORRÊA, M. D. Fisiopatologia da pré-eclâmpsia: aspectos atuais. *Femina*, v. 37, n. 5, 2009.

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*, v. 174, n. 3, p. 1008-13, 1996.

DUSSE, L. M. et al. Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras Patol Med Lab*, v. 39, n. 343-350, 2003.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Rev. Assoc. Med. Bras*, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

GHASEMI, A.; ZAHEDIASL, S.; AZIZI, F. Reference values for serum nitric oxide metabolites in an adult population. *Clin Biochem*, v. 43, n. 1-2, p. 89-94, 2010.

GOMES, R. et al. Os sentidos do risco na gravidez segundo a obstetrícia: um estudo bibliográfico. *Rev Latino-Am Enfermagem*, v. 9, n. 4, p. 62-67, 2001.

GOUVEIA, H. G.; LOPES, M. H. B. M. Diagnósticos de enfermagem e problemas colaborativos. *Rev Latino-am Enfermagem*, v. 12, n.2, p. 175-82, 2004.

GROVES, J. T.; WANG, C. C. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Curr Opin Chem Biol*, v. 4, n. 6, p. 687-95, 2000.

HATA, T. et al. Maternal circulating nitrite levels are decreased in both normal normotensive pregnancies and pregnancies with preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest*, v. 48, n. 2, p. 93-7, 1999.

KLEINBONGARD, P. et al. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med*, v. 35, n. 7, p. 790-6, 2003.

KOHLMANN Jr, O. et al. III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 43, n. 4, p. 257-286, 1999.

LYALL, F.; YOUNG, A.; GREER, I. A. Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, v.17, n. 714-18, 1995.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, v. 5, n. 1, p. 62-71, 2001.

MOARES, A. Q. Morte materna: abordagem epidemiológica. *Rev Inst Ciênc Saúde*, v. 26. n. 1, p. 16-20, 2008.

MORAIS, F. M. et al. Uma revisão do perfil clínico-epidemiológico e das repercussões perinatais em portadoras de síndrome hipertensiva gestacional. *Rev EIXO*, v. 2, n. 1, p. 69-82, 2013.

NAKAOKA, V. Y. et al. Sulfatação na Eclâmpsia: revisão de literatura. *Rev Uningá Review*, v. 16, n. 1, p. 55-58, 2013.

NASCIMENTO, T. L. C.; BOCARDI, M. I. B.; ROSA, M. P. R. S. Doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG) em adolescentes: uma revisão de literatura. *Ideias & Inovação*, v. 2, n. 2, p. 69-76, 2015.

NOBUNAGA, T. et al. Plasma nitric oxide levels in pregnant patients with preeclampsia and essential hypertension. *Gynecol Obstet Invest*, v. 41, n. 3, p. 189-93, 1996.

NOVO, J. L. V. G.; GIANINI, R. J. Mortalidade materna por eclâmpsia. *Rev Bras Saúde Matern Infant*, v. 10, n. 2, p. 209-217, 2010.

OLIVEIRA, C. A. et al. Síndromes hipertensivas da gestação e repercussões perinatais. *Rev Bras Saude Mater Infant*, v. 6, n. 1, p. 93-98, 2006.

OLIVEIRA, et al. Fatores maternos e perinatais na pré-eclâmpsia. *Arq Bras Cardiol*, 2015.

OLIVEIRA, L. G.; KARUMANCHI, A.; SASS, N. Pré-eclâmpsia: estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 32, n. 12, p. 609-616, 2010.

OMS- Organização Mundial de Saúde. Eclâmpsia: Manual para Professores de Enfermagem Obstétrica. Genebra: OMS, 2005.

PATHAK, N. et al. Estimation of oxidative products of nitric oxide (nitrates, nitrites) in preeclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, v. 39, n. 4, p. 484-7, 1999.

PEREIRA, M. N.; MONTENEGRO, C. A. B.; REZENDE FILHO, J. Síndrome HELLP: diagnóstico e conduta. *Femina*, v. 36, n. 2, p. 111-116, 2008.

RANTA, V. et al. Nitric oxide production with preeclampsia. *Obstet Gynecol*, v. 93, n. 3, p. 442-5, 1999.

REIS, Z. S. N. et al. Pressão arterial e concentração plasmática do peptídeo atrial natriurético e do peptídeo natriurético tipo B, em gestações complicadas pela pré-eclâmpsia. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 25, n. 6, p. 413-418, 2003.

REZENDE, J.; MONTENEGRO, C. A. B. **Obstetrícia fundamental**. 11ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 2004.

SANTOS, D. T. A., CAMPOS, C. S. M, DUARTE, M. L. Perfil das patologias prevalentes na gestação de alto risco em uma maternidade escola de Maceió, Alagoas, Brasil. *Rev Bras Med Fam Comunidade*, v. 9, n. 30, p. 13-22, 2014.

SANTOS, G. H. N. et al. Impacto da idade materna sobre os resultados perinatais e via de parto. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 31, n. 7, p. 326-334, 2009.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, Á. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte*, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.

SIQUEIRA, F. et al. Medicamentos anti-hipertensivos na gestação e puerpério. *Comum Ciênc Saúde*, v. 22, n. sup esp 1, p. 55-68, 2011.

SHAAMASH, A. H. et al. Maternal and fetal serum nitric oxide (NO) concentrations in normal pregnancy, preeclampsia and eclampsia. *In J Gynaecol Obstet*, v. 68, n. 3, p. 207-14, 2000.

SOUZA, A. S. R. et al. Pré-eclâmpsia. *Femina*, v. 34, n. 7, 2006.

SPADA, F. R. et al. Alterações retinianas na doença hipertensiva específica da gestação. *Arq Catarin Med*, v. 34, n.1, 2005.

SUS-BH. Prefeitura Municipal de Belo Horizonte. Protocolo do Acolhimento com Classificação de Risco em Obstetrícia e Principais Urgências Obstétricas. Belo Horizonte, 2010.

TADESCO, R. P. et al. Hipertensão arterial crônica na gestação: consenso e controvérsias. *Rev ciênc méd*, v. 13, n. 2, p. 161-171, 2004.

TEIXEIRA, S. A. M. A importância do óxido nítrico na pré-eclâmpsia. *Femina*, v.34, n.8, 2006.

ZIEGEL, E. E.; CRANLEY, M. S. Enfermagem Obstétrica. 8ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985, p. 265-266.

WEITZBERG, E.; HEZEL, M.; LUNDBERG, J. O. Nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. *American Society of Anesthesiologists*, v. 113, n. 6, p. 1460-75, 2010.

ANEXO

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

HOSPITAL GUILHERME ALVARO	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	
Elaborado pela Instituição Coparticipante	
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA	
Título da Pesquisa: A pré-eclâmpsia em um hospital de referência: associação com a hipotoxicidade.	
Pesquisador: Francisco Lázaro Pereira de Souza	
Área Temática:	
Versão: 1	
CAAE: 27376814.0.3001.5448	
Instituição Proponente: FUNDACAO LUSIADA	
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio	
DADOS DO PARECER	
Número do Parecer: 886.163	
Data da Relatoria: 09/06/2014	
Apresentação do Projeto:	
Adequado	
Objetivo da Pesquisa:	
Adequado	
Avaliação dos Riscos e Benefícios:	
Sem riscos	
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:	
Adequado	
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:	
Adequado	
Recomendações:	
Nenhuma	
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:	
Parecer Favorável	
Situação do Parecer:	
Aprovado	

APÊNDICES

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- 1. Título do projeto:** *Oxido Nitrico na Pré-Eclâmpsia – Correlações Clínicas e Níveis Séricos*
- 2. Desenho do Estudo e Objetivo:** Trata-se de um estudo caso-controle com o objetivo de avaliar a correlação do Oxido Nitrico em gestantes com e sem pré-eclâmpsia (PE) no pós-parto mediato, no puerpério tardio (12 e 24 semanas) e um ano após o nascimento, em um hospital de referência.
- 3. Descrição dos procedimentos:** Serão analisados os seguintes dados maternos: idade, presença de comorbidades, IMC segundo a fórmula: $[\text{peso}/(\text{altura})^2]$, desfecho pós-parto e coletadas amostras sanguíneas destas puérperas no pós-parto mediato para avaliação do Oxido Nitrico. Concomitantemente, serão avaliados dados neonatais, como idade gestacional, peso do recém-nascido (RN), Apgar no primeiro minuto e no quinto minuto, vitalidade do RN e admissão na UTI neonatal. Além de ser realizado uma entrevista em forma de questionário com intuito de se identificar dados sociais das mulheres estudadas.
- 4. Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados:** As participantes serão orientadas sobre a pesquisa e questionadas se concordam em participar. Caso aceitem, serão submetidas à coleta de amostra sanguínea para realização de exame bioquímico e cederão seus dados juntamente com os dados de seus neonatos. O pesquisador, único a aplicar o questionário, esclarecerá as possíveis dúvidas que aparecerem com relação às questões. Após 12, 24 semanas e um ano, a participante será procurada novamente pelo pesquisador e responderá a um outro questionário e será feita nova coleta de sangue para repetir os exames, a fim de avaliar a evolução da paciente e os valores de Oxido Nitrico.
- 5. Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos itens 3 e 4:** Algumas pacientes podem apresentar eventualmente um desconforto local e equimose (mancha avermelhada no local de punção, com melhora espontânea).
- 6. Benefícios para o participante:** A participação neste estudo pode fornecer informações sobre a correlação entre o Oxido Nitrico e a doença hipertensiva gestacional, pré-eclâmpsia, posteriormente facilitando seu diagnóstico e possíveis intervenções, além de melhorar o prognóstico e oferecer melhor qualidade de vida para estas gestantes e seus filhos. Sendo assim, permitir-se-à que outras gestantes se beneficiem no futuro desta pesquisa com melhores tratamentos e redução dos riscos, porém não existe qualquer garantia de benefícios direto como resultado da participação neste estudo. As novas coletas permitirão um acompanhamento da paciente até um ano após o parto, com avaliação da saúde da paciente e realização de novos exames de sangue para avaliar se as variáveis alteradas foram normalizadas.
- 7. Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos e pelos qual a participante possa optar:** A participante que aceitar fazer parte deste estudo não será abdicada de nenhuma outra forma de terapia ou procedimentos alternativos.
- 8. Garantia de acesso em qualquer etapa do estudo:** A participante terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os pesquisadores deste estudo são os acadêmicos em medicina Mariela Degan Barros Battistella, Mariana Temperani da Silva, Barbarah Silveira Penstti, Dr. Diego Gomes Ferreira e Dr. Francisco Lázaro Pereira de Sousa, que podem ser encontrados no Hospital Guilherme Álvaro, à Rua Dr. Oswaldo Cruz, 197, bairro Boqueirão na cidade de Santos/SP, ou pelos celulares (19)98431-7000, (11)96388-3607 ou (19)99787-4144. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa ou seus direitos como participante da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Guilherme Álvaro situado a Rua Oswaldo Cruz 197, Boqueirão, Santos/SP, Telefone/Fax. x 013/32021306 e falar com o Coordenador Dr.Silvio Carlos de Moraes Santos.
- 9. Descrever sobre a liberdade da retirada do consentimento:** Sua participação é voluntária, ou seja, você pode decidir não participar deste estudo. Caso queira participar do estudo é garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento, sem precisar explicar a razão. Deixar de participar do estudo não acarreta qualquer prejuízo a continuidade de sua assistência.

Direito de confidencialidade: Todos os dados coletados durante este estudo serão usados apenas para os fins explicados neste termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo somente poderá ser feito através da coleta e uso de suas informações médicas. As leis brasileiras dão a você o direito de controlar o uso e ter acesso às suas informações médicas. Suas informações obtidas neste estudo serão mantidas sempre de forma confidencial. Isto significa que seu nome jamais será divulgado, você será sempre identificada apenas através de três letras (iniciais do seu nome), incluindo na sua identificação em todos os relatórios ou publicações que possam resultar desta pesquisa, a não ser que a lei exija o contrário. Os pesquisadores tomarão todas as medidas necessárias para preservar o sigilo e sua privacidade de suas informações médicas, inclusive quanto

desta pesquisa, a não ser que a lei exija o contrário. Os pesquisadores tomarão todas as medidas necessárias para preservar o sigilo e sua privacidade de suas informações médicas, inclusive quanto ao acesso aos seus registros médicos relacionados ao estudo. Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você está permitindo que suas informações médicas relacionadas ao estudo sejam verificadas, anotadas em fichas próprias para este estudo, analisadas e reportadas. Além disso, os resultados deste estudo serão divulgados, sejam eles favoráveis ou não, conforme necessário, para finalidades científicas. Os resultados do estudo poderão ser processados e relatados, conforme necessário, para finalidades científicas legítimas, sempre de uma forma confidencial (em segredo). Os resultados do estudo que se tornarem públicos podem ser usados para ajudar no desenho e planejamento de estudos futuros. Você poderá retirar sua autorização a qualquer momento. Se você retirar sua autorização, sua participação no estudo será finalizada e a equipe do estudo suspenderá a coleta de informações sobre você. Além disso, a equipe do estudo irá parar de usar suas informações e interromperá a divulgação das mesmas, a não ser aquelas que já foram obtidas sobre você. Por exemplo, para preservar a integridade científica do estudo, a equipe do estudo poderá necessitar do uso ou divulgação de informações obtidas antes de você ter retirado sua autorização.

1. Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou sobre resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores:

Os pesquisadores Mariela Degan Barros Battistella, Mariana Temperani da Silva, Barbarah Silveira Penatti, Dr. Diego Gomes Ferreira e Dr. Francisco Lázaro Pereira de Sousa, responsáveis pelo estudo, informarão a você, assim que possível, sobre qualquer descoberta que possa influenciar a sua vontade de continuar a participar deste estudo, assim como os resultados oriundos desta pesquisa serão tornados públicos sejam eles favoráveis ou não.

2. Despesas e compensações: Você não será pago por sua participação neste estudo. Não haverá custos para você relacionados aos procedimentos deste estudo, inclusive com visitas médicas caso necessárias. Estes custos e o financiamento desta pesquisa estão sendo fornecidos pelos pesquisadores responsáveis.

3. Direitos em caso de dano pessoal e indenizações: Em caso de dano pessoal diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), a participante tem direito a tratamento e acompanhamento fornecidos pelo Centro Universitário Lusíada e pelos pesquisadores responsáveis, bem como indenizações legalmente estabelecidas.

4. Compromisso do pesquisador: Os pesquisadores Mariela Degan Barros Battistella, Mariana Temperani da Silva, Barbarah Silveira Penatti, Dr. Diego Gomes Ferreira e Dr. Francisco Lázaro Pereira de Sousa se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito de todo conteúdo lido ou que foram lidos para mim, descrevendo a pesquisa intitulada "Óxido Nítrico na Pré-eclâmpsia. Correlações Clínicas e Níveis Séricos". Eu discuti com os acadêmicos Mariela Degan Barros Battistella, Mariana Temperani da Silva, Barbarah Silveira Penatti, Dr. Diego Gomes Ferreira e Dr. Francisco Lázaro Pereira de Sousa minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes, durante ou mesmo após seguimento no estudo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu atendimento.

_____	_____
Nome da participante	RG
_____	____/____/____
Assinatura da participante	Data

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou de seu representante legal para a participação neste estudo.

_____	_____
Nome do responsável pelo consentimento	RG
_____	____/____/____
Assinatura do responsável pelo consentimento	Data

APÊNDICE 2

QUESTIONÁRIO OBSTÉTRICO

Nº PRONT: _____ SUS: _____ GRUPO: _____
 DATA DO PARTO: _____ DATA: _____ IDADE: _____
 NOME: _____ DATA
 DE NASCIMENTO: ____/____/____
 STATUS SOCIO-ECONÔMICO: () A () B1 () B2 () C1 () C2 () D () E COR/RAÇA: _____
 QUANTAS PESSOAS VIVEM DESSA RENDA? _____
 GRAU DE ESCOLARIDADE: _____ NATURALIDADE: _____ ESTADO CIVIL: _____
 OCUPAÇÃO: _____
 Endereço: _____
 Telefone: _____ Celular: _____

ANAMNESE OBSTÉTRICA

PRÉ-NATAL: () SIM QUANTAS? () 0 () 1-5 () 6 OU +
 ACESSO FÁCIL AO PRÉ-NATAL: () SIM () NÃO
 GRAVIDEZ ACEITA: () SIM () NÃO PLANEJADA? () SIM () NÃO
 CONHECIMENTO DA MULHER: SOBRE OS SINAIS DE PERIGO DA GRAVIDEZ:
 SINAIS DE ALERTA: DOR DE CABEÇA PERSISTENTE ()
 VISÃO EMBAÇADA ()
 DOR ABDOMINAL ()
 VERTIGEM ()
 VÔMITO FREQUENTE ()
 INDISPOSIÇÃO ()

ANTECEDENTES OBSTÉTRICOS

GESTAÇÕES ANTERIORES: _____
 INTERVALO ENTRE AS GESTAÇÕES: _____
 CESÁRIA PRÉVIA: () SIM QUANTAS? _____ () NÃO
 PRÉ-ECLÂMPZIA/ECLÂMPZIA PRÉVIA:
 HEMORRAGIA: () 1º METADE () 2º METADE () PÓS-PARTO
 ÓBITO FETAL PRÉVIO: NÃO () SIM () QUANTOS?
 ABORTO () ÚNICO () HABITUAL
 NEOMORTO () PRECOCE () TARDIO
 PREMATUROS: _____ BAIXO PESO: _____
 GEMELAR: _____ MACROSSOMICOS: _____
 DPP: _____ PE: _____ PE+HAC: _____

ANTECEDENTES PESSOAIS

DIABETES() HIPERTENSÃO() DOENÇA FALCIFORME() HIV/AIDS() OUTROS()
 STATUS NUTRICIONAL:
 PESO: _____ ALTURA: _____ IMC: _____
 Circ abdominal: _____ Circ. Braç _____ Circ. Pescoço: _____
 COMORBIDADES: _____

FATORES CLÍNICOS /OBSTÉTRICOS

IDADE GESTACIONAL NA ADMISSÃO: _____
 PRESSÃO ARTERIAL NA ADMISSÃO: _____
 RUPTURA PREMATURA DAS MEMBRANAS OVULARES: _____
 APRESENTAÇÃO ANÔMALA: _____ SANGRAMENTO VAGINAL: _____
 INTERNAÇÃO HOSPITALAR PRÉVIA AO PARTO () SIM () NÃO
 NÚMERO DE INTERNAÇÕES 1() 2() MAIS DE 2()
 DIAS DE INTERNAÇÕES HOSPITALARES ATÉ O PARTO: _____
 DIAGNOSTICO ETIOLÓGICO POSSÍVEL DE HAC: _____
 DROGAS UTILIZADAS:
 () ALFAMETILDOPA () PINDOLOL () NIFEDIPINA () HIDRALAZINA () SULFATO DE MG
 SE HIPERTENSA:
 () HIPERTENSÃO ARTERIAL GESTACIONAL TARDIA
 () PRE- ECLÂMPZIA
 () HIPERTENSÃO ARTERIAL CRÔNICA: () LEVE (PAD 90|— 100)
 () MODERADA (PAD 100|—110)
 () GRAVE (PAD ≥110)

PRÉ-ECLÂMPZIA SOBREPOSTA

CRITÉRIOS DE GRAVIDADE DE PRÉ-ECLÂMPZIA

PA \geq 160x110 mmHg

PROTEINÚRIA > 2g/24H

CREATININA >1,2 mg/DI

PLAQUETAS <100.000

ELEVAÇÃO DE ENZIMAS HEPÁTICAS

SINTOMATOLOGIA CENTRAL

DOR EPIGÁSTRICA

DADOS DO PARTO

IDADE GESTACIONAL DO PARTO:

MENOS QUE 28 SEMANAS

28-31 SEMANAS E 6 DIAS

32-34 SEMANAS E 6 DIAS

35-36 SEMANAS E 6 DIAS

MAIOR QUE 37 SEMANAS

INDICAÇÃO PRINCIPAL:

MATERNA QUAL?

FETAL QUAL?

CORTICOTERAPIA: SIM 1 CICLO 2 CICLOS NÃO

INDUÇÃO:

SIM MÉTODO: MISOPROSTOL OCITOCINA KRAUSER

NÃO

SUCESSO NA INDUÇÃO: SIM NÃO

TIPO DE PARTO:

VAGINAL

CESARIANA: INCISÃO SEGMENTAR SEGMENTO CORPORAL CORPORAL-

FUNDICA PARTO FÓRCEPS

ANESTESIA

RAQUI

PERIDURAL

GERAL

LÍQUIDO AMNIÓTICO MECONIAL NO PARTO: SIM NÃO

MATERNA

NECESSIDADE DE INTERNAÇÃO NA UTI: SIM NÃO

DIAS DE INTERNAÇÃO: MENOS DE TRÊS DIAS

ENTRE TRÊS E SETE DIAS

ENTRE SETE E CATORZE DIAS

ÓBITO: SIM NÃO

SEQUELAS: SIM NÃO QUAIS?: _____

RECÉM-NASCIDO

NATIVO NATIMORTO PESO:

APGAR: 1° MIN _____ 5° MIN _____

CAPURRO: PIG AIG GIG

NECESSIDADE DE INTERNAÇÃO NA UTI: SIM NÃO

DIAS DE INTERNAÇÃO:

MENOS DE TRÊS DIAS

ENTRE TRÊS E SETE DIAS

ENTRE SETE E CATORZE DIAS

NECESSIDADE DE VENTILAÇÃO ASSISTIDA: SIM NÃO

APÊNDICE 3

ORIENTAÇÕES GERAIS E DIETÉTICAS PARA A COLETA DE SANGUE

Nome: _____

Dia do Exame: ___/___/___ Horário: _____

Local: Maternidade Escola - UFRJ

1) ORIENTAÇÕES GERAIS PARA A REALIZAÇÃO DOS EXAMES LABORATORIAIS

- ❖ Jejum de 12 horas antes dos exames;
- ❖ Não tomar bebidas alcoólicas 48 horas antes;
- ❖ Um dia antes evitar refeições pesadas ricas em gorduras e açúcar, consumidas em excesso;
- ❖ Não realizar atividade física intensa 24 horas antes;
- ❖ Não tomar vitamina C ou qualquer outro suplemento vitamínico.

2) ORIENTAÇÕES DIETÉTICAS

- ❖ **Não comer**, nas 24 horas anteriores à coleta, os seguintes alimentos devido ao alto teor de nitrito/nitrato:

Legumes, verduras e preparações	Todas
Frutas	Todas, exceto maçã e pêra
Bebidas em geral e sucos	Café, mate, coca-cola, chá comum e preto, sucos de frutas naturais e artificiais (com vitamina C), bebidas alcoólicas
Carnes e derivados	Bacon, presunto, embutidos (linguiça, salsicha, salame), carnes vermelhas, enlatados, ovo, queijos processados, peixe em conserva (sardinha em lata)
Condimentos	Ervas (salsinha, cebolinha, manjeriço, ervas finas, coentro, alecrim, etc.), ketchup, mostarda, maionese
Demais alimentos	Pizza congelada, queijos amarelos, chocolate, cogumelo, aspargo, ervilha, feijão verde

- ❖ Sugestão de cardápio a ser seguido no dia anterior ao exame:

Café da manhã	Leite/lorurte/Coalhada Pão/Torrada Requeijão/Queijo minas
Lanche	Maçã ou pêra
Almoço	Arroz/Macarrão (sem molho de tomate) Feijão Frango/Peixe Sobremesa: gelatina ou doce
Lanche	Leite/lorurte/Coalhada Pão/Torrada Requeijão/Queijo minas
Jantar	Arroz/Macarrão (sem molho de tomate) Feijão Frango/Peixe Sobremesa: gelatina ou doce
Ceia	Maçã ou pêra

Qualquer dúvida, entrar em contato com os pesquisadores:

Leda Maria Ferraz da Silva - (21) 983786243 (tim)

Patrícia de Fátima Lopes de Andrade - (21) 980308672 (tim)/ (21) 973057223 (claro)