

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Medicina**

**AVALIAÇÃO DA ANGIOTENSINA II, ANGIOTENSINA 1-7,  
RECEPTOR Mas E DA ENZIMA CONVERSORA DE  
ANGIOTENSINA 2 DO SISTEMA RENINA-  
ANGIOTENSINA, EM FETOS COM DIAGNÓSTICO  
ULTRASSONOGRÁFICO DE CRESCIMENTO  
INTRAUTERINO RESTRITO.**

**JULIANA SILVA BARRA**

**Belo Horizonte**

**2009**

**JULIANA SILVA BARRA**

**AVALIAÇÃO DA ANGIOTENSINA II, ANGIOTENSINA 1-7,  
RECEPTOR Mas E DA ENZIMA CONVERSORA DE  
ANGIOTENSINA 2 DO SISTEMA RENINA-  
ANGIOTENSINA, EM FETOS COM DIAGNÓSTICO  
ULTRASSONOGRÁFICO DE CRESCIMENTO  
INTRAUTERINO RESTRITO.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor na área de concentração em Ginecologia e Obstetrícia.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Vítor Leite.

**Belo Horizonte**  
**Faculdade de Medicina-UFMG**  
**2009**



*AOS MEUS  
AMORES,  
JOSÉ E ALEXANDRE.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

Ao Prof. Henrique Vitor Leite, por mais uma vez ter acreditado em mim profissionalmente, orientando-me e conduzindo-me para que tudo se tornasse possível. Incansável exemplo de persistência e sabedoria

À Prof<sup>a</sup>. Adelina Martha dos Reis, pela amizade e também por mais uma vez ter me dado a oportunidade de estar ao seu lado durante toda a minha formação científica, orientando-me e permitindo minha evolução científica.

À Dr<sup>a</sup>. Myrian Celani e à Dr<sup>a</sup>. Madalena Martins, por me acolherem sempre.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Vieira Cabral, pelo auxílio no meu aprendizado profissional e exemplo de dedicação universitária.

Aos amigos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), especialmente às amigas Virgínia Mara Pereira e Jacqueline Braga, pelo carinho.

Ao Prof. Fernando Reis, grande exemplo desde a minha primeira experiência científica em 1995 e por permitir trabalharmos juntos até hoje e, espero, sempre.

Ao Prof. Robson Santos, pela importante colaboração e apoio.

À Isabela Gomes, Raquel Walesca, Erika Becker e Willian Schneider, pela amizade.

À Prof<sup>a</sup>. Paula Vidigal, pelo apoio neste trabalho.

Aos amigos da Polícia Militar, pela compreensão.

Ao José, pelas gargalhadas, abraços, beijos, choros e birras, que traduzem os dias em Felicidade.

Ao Alexandre, pelo apoio mesmo nos momentos mais difíceis, mostrando que o melhor sentido para viver é o Otimismo e o melhor caminho é a Felicidade.

Aos meus pais, pelo carinho e dedicação.

Ao Dr. Barra e D<sup>a</sup>. Regina, pelo apoio e acolhimento como filha.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos.

À Marta, por toda a sua dedicação.

À Marilene, pelo carinho, nova amizade imprescindível neste trabalho.

Às pacientes, que permitiram que seus filhos participassem deste trabalho em um momento de angústia e esperança.

## RESUMO

**Introdução/objetivos:** estudos demonstram que o sistema renina-angiotensina tem função significativa na regulação do fluxo sanguíneo útero-placentário e, portanto, no desenvolvimento fetal. **Métodos:** foram avaliados fetos com critérios ultrassonográficos e dopplerfluxométricos de restrição do crescimento intrauterino (CIUR), divididos nos grupos pequenos para a idade gestacional (PIG) e adequados para a idade gestacional (AIG) e depois subdivididos em igual ou inferior a 35 semanas ou acima de 35 semanas. No momento da cesariana, foram colhidos 10 mL de sangue do cordão umbilical e sangue materno, a partir dos quais foi feita dosagem por radioimunensaio dos peptídeos. A imunexpressão dos mesmos foi vista na placenta e no cordão umbilical. **Resultados/conclusão:** verificou-se que a expressão de angiotensina II tendeu a ser maior na placenta dos fetos com CIUR abaixo de 35 semanas, embora sem diferença estatística. A expressão de angiotensina 1-7 mostrou-se maior na placenta de fetos AIG, mas não houve diferença estatística, pelo baixo número de casos. A enzima conversora de angiotensina (ECA2), que converte angiotensina II e angiotensina 1-7, teve maior expressão na placenta de fetos AIGs. No cordão umbilical, a expressão de angiotensina II e angiotensina 1-7 esteve aumentada nos fetos com CIUR, mas sem diferença estatística. Os níveis plasmáticos de angiotensina II e angiotensina 1-7 também não demonstraram diferença. O nível de angiotensina II materno dos fetos com CIUR em relação aos fetos AIGs não mostrou diferença estatística. Mas o nível de angiotensina 1-7 no plasma materno encontrou-se estatisticamente mais elevado no grupo de fetos com CIUR em relação aos fetos normais abaixo de 35 semanas, indicando a possível participação desse peptídeo na regulação do fluxo sanguíneo placentário.

Palavras-chave: Sistema renina-angiotensina. Crescimento intrauterino restrito. Enzima conversora de angiotensina.

## ABSTRACT

**Introduction/objective:** Studies demonstrate that the angiotensina renina system has significant function in the regulation of the sanguineous flow placentary uterus e, therefore, in the fetal development. **Methods:** Ultrassonografics and dopplerfluxometrics criteria of restriction of the intrauterine growth that had been divided in the groups small for the gestacional age (PIG) and adjusted for the gestacional age (AIG) and later subdivided in minors or equal the 35 weeks or greater had been studied embryos with that 35 weeks. At the moment of the cesariana ml of blood of the umbilical lace and maternal blood had been harvested 10, from which dosage for radioimunensaio of the peptideos was made. The imunoexpressão of the same ones was seen in the placenta and umbilical lace. **Results/conclusion:** We verify that the expression of Angiotensina II tends to be bigger in the placenta of the embryos with CIUR below of 35 weeks, even so without difference statistics. We verify that the expression of angiotensina 1-7 tends to be bigger in the placenta of embryos AIG, but did not have difference statistics for the small number of cases. The converting enzyme of angiotensina, ECA2, that converts angiotensina II and angiotensina 1-7, tends to have greater expression in the placenta of adequate embryos AIG. In the umbilical lace the expression of angiotensina II and angiotensina 1-7 tends to be increased in the embryos with CIUR, but it did not have difference statistics. The plasmatics levels of angiotensina II and angiotensina 1-7 had also not demonstrated difference. The maternal level of angiotensina II of the embryos with CIUR in relation to embryos AIG did not show estatística difference. But the level of angiotensina 1-7 in the plasma maternal statistical meets in the group of embryos with CIUR in relation to the normal embryos below of 35 weeks, indicating possible participation of this peptideo in the regulation of the placentary sanguineous flow higher.

Keys words: Angiotensina renina system. Restriction of the intrauterine growth. Converting enzyme of angiotensina.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIG	Adequado para a idade gestacional
ACN	Acetonitrila
AMP	Aminopectidase
ANG	Angiotensina
BE	Excesso de base
BSA	Solução tampão albumina
CA	Circunferência abdominal
CEMEF	Centro de Medicina Fetal
CIUR	Crescimento intrauterino restrito
cpm	Centrifugações por minuto
DBP	Diâmetro biparietal
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HC	Hospital das Clínicas
HCl	Hipoclorido
HFBA	Ácido heptafluorobutírico
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IHC	Imunoistoquímica
IP	Índice de pulsatilidade
HAC	Hipertensão arterial crônica
NaCl	Cloreto de sódio
NEP	Endopeptidase neutra
PAM	Pressão arterial média
PCP	Prolil-carboxipeptidase
PEP	Prolil-endopeptidase
pH	Potencial de Hidrogênio
PIG	Pequeno para a idade gestacional
RIE	Radioimunoensaio
rpm	Rotação por minuto
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro

SRA	Sistema renina-angiotensina
U/C	Umbilico/cerebral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Figura

FIGURA 1 Cascata bioenzimática do sistema renina-angiotensina.....	22
FIGURA 2 Lâminas de angiotensina (1-7) placenta.....	34

### Gráficos

GRÁFICO 1 Distribuição de angiotensina-(1-7) placenta entre os grupos.....	35
GRÁFICO 1 Distribuição de angiotensina-(1-7) no cordão entre os grupos.....	36
GRÁFICO 3 Distribuição de angiotensina II na placenta entre os grupos.....	37
GRÁFICO 4 Distribuição de angiotensina II no cordão entre os grupos.....	38
GRÁFICO 5 Distribuição do <i>MAS</i> na placenta entre os grupos.....	39
GRÁFICO 6 Distribuição de <i>MAS</i> no cordão entre os grupos.....	40
GRÁFICO 7 Distribuição de ECA na placenta entre os grupos.....	41
GRÁFICO 8 Distribuição de ECA no cordão entre os grupos.....	42
GRÁFICO 9 Concentração de angiotensina II mãe.....	44
GRÁFICO 10 Agrupamento dos casos de CIUR para angiotensina II mãe.....	45
GRÁFICO 11 Concentração de angiotensina II feto.....	45
GRÁFICO 12 Agrupamento dos casos de CIUR para angiotensina II feto.....	46
GRÁFICO 13 Angiotensina-(1-7) mãe.....	46
GRÁFICO 14 Agrupamento dos casos de CIUR para angiotensina-(1-7) mãe.....	47
GRÁFICO 15 Angiotensina-(1-7) feto.....	47
GRÁFICO 16 Agrupamento dos casos de CIUR para angiotensina-(1-7) feto.....	48
GRÁFICO 17a Dispersão para todas as variáveis <i>versus</i> U/C dos fetos com CIUR..	49
GRÁFICO 17b Dispersão para todas as variáveis <i>versus</i> U/C dos fetos com CIUR.	50
GRÁFICO 17c Dispersão para todas as variáveis <i>versus</i> U/C dos fetos com CIUR..	51
GRÁFICO 18 Distribuição da idade materna entre os grupos.....	51
GRÁFICO 19 Distribuição da pressão arterial média materna entre os grupos.....	52
GRÁFICO 20 Distribuição do peso fetal entre os grupos.....	52

### Quadros

QUADRO 1 Soluções e volumes utilizados para RIE de Ang-(1-7).....	31
QUADRO 2 Soluções e volumes utilizados para RIE de Ang II.....	32

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Expressão da angiotensina-(1-7) na placenta de fetos com restrição de crescimento e fetos com crescimento adequado.....	35
TABELA 2 Expressão da angiotensina-(1-7) no cordão de fetos com restrição de crescimento e fetos com crescimento adequado.....	36
TABELA 3 Expressão da angiotensina II na placenta de fetos com restrição de crescimento e fetos com crescimento adequado.....	37
TABELA 4 Expressão da angiotensina II no cordão de fetos com restrição de crescimento e fetos com crescimento adequado.....	38
TABELA 5 Expressão do <i>MAS</i> na placenta de fetos com restrição de crescimento e fetos com crescimento adequado.....	39
TABELA 6 Expressão do <i>MAS</i> no cordão de fetos com restrição de crescimento e fetos com crescimento adequado.....	40
TABELA 7 Expressão da ECA na placenta de fetos com restrição de crescimento e fetos com crescimento adequado.....	41
TABELA 8 Expressão de ECA no cordão de fetos com restrição de crescimento e fetos com crescimento adequado.....	42
TABELA 9 Resultados dos testes <i>Kruskal-Wallis</i> .....	43

# SUMÁRIO<sup>1</sup>

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Sistema renina-angiotensina.....	20
2.2 Sistema renina-angiotensina e gestação.....	23
2.3 Sistema renina-angiotensina e restrição do crescimento fetal.....	24
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivo específico.....	26
4 PACIENTES E MÉTODOS.....	27
4.1 Pacientes.....	27
4.2 Métodos.....	28
4.2.1 Imunoistoquímica para angiotensina II, angiotensina-(1-7) proto-oncogene <i>Mas</i> e enzima conversora de angiotensina II (ECAII).....	28
4.2.2 Radioimunensaio.....	29
4.2.2.1 Radioimunoensaio para Ang-(1-7).....	30
4.2.2.2 Radioimunoensaio para Ang II.....	31
5 RESULTADOS.....	34
5.1 Análise de correlação.....	48
6 COMENTÁRIOS.....	53
7 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
APÊNDICE E ANEXO.....	62

---

<sup>1</sup> Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas.

# 1 INTRODUÇÃO

O avanço da Ciência não foi capaz ainda de mudar a história natural de algumas doenças que podem levar à restrição do crescimento intraútero (CIUR), nem mesmo reverter esse quadro quando diagnosticado. O maior número de estudos que tentem compreender as alterações que ocorrem quanto ao crescimento fetal podem auxiliar em técnicas de diagnóstico precoce destes quadro ou mesmo na possibilidade de sua reversão.

O estudo das alterações do crescimento intraútero tem sido um dos objetivos do Centro de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEMEFE-HC/UFGM), sob orientação do Prof. Antonio Carlos Vieira Cabral. Muitos destes estudos, que vem ocorrendo ao longo das últimas duas décadas visam a conhecer aspectos relacionados a fisiopatologia e ao diagnóstico do crescimento intra-uterino restrito.

Assim como a restrição do crescimento intraútero pode ser de etiologia multifatorial, acredita-se que as pesquisas de suas causas, condução e tratamento também devam ser multidisciplinares, buscando-se intensificar todas as condições nessa situação.

Um dos aspectos importantes que devem ser lembrados nos estudos orientados pelo professor Cabral esta na aproximação entre a área clínica, representada pelo CEMEFÉ-HC/UFGM, e a área básica, representada pelo Departamento de Fisiologia da UFGM, com a imprescindível colaboração da Prof<sup>a</sup>. Adelina Marta dos Reis e do Prof. Robson Santos.

Este estudo demonstra o esforço de unir esferas muito diferentes e que deveriam estar interligadas com o mesmo objetivo que seria o de melhorar os conhecimentos da ciência e a possibilidade de ampliar os métodos de propedêutica do binômio mãe-filho. Muitas vezes, a área clínica é objetiva para resolver os casos de restrição de crescimento intraútero, pela sua ansiedade de ter resultado satisfatório; e a área básica é mais intensa para aprofundar buscas que irão solucionar definitivamente dúvidas importantes por se debruçar na identificação dos aspectos fisiopatológicos.

A minha inserção nestes estudos vem do tempo de graduação, em que tive grande envolvimento com pesquisas básicas. Ao fazer minha residência médica de ginecologia e obstetrícia tive a oportunidade de me aproximar do serviço coordenado pelo professor Cabral, sendo orientada na dissertação de mestrado pelo Professor Henrique Vitor Leite. A necessidade de aproximar a área clínica da pesquisa básica e em um tema de grande relevância quanto o estudo das alterações de crescimento intra-útero me motivou muito no desenvolvimento desta pesquisa.

A restrição do crescimento intraútero é uma condição complexa devido a muitos fatores e ocorre em humanos como consequência de condições maternas (nutrição inadequada, uso de drogas e hábitos de vida inadequados), doenças que levam a insuficiência placentária (hipertensão arterial crônica, vasculopatias, etc) e a diminuição da oxigenação fetal. Outras situações seriam as doenças cromossômicas e genéticas, anomalias estruturais, infecções e agentes externos como medicações e radiação.

O sistema renina-angiotensina tem função significativa na regulação do fluxo sanguíneo útero-placentário devido à presença de receptores de angiotensina, bem como à participação na decidualização, placentação e implantação. Em 1994, Knock *et al.* observaram que alterações no sistema renina angiotensina podem levar a: diminuição do fluxo útero-placentário, pré-eclampsia e CIUR.

A restrição do crescimento intraútero (CIUR) é o segundo fator de contribuição para a taxa de mortalidade perinatal devido à prematuridade e à asfíxia intraparto, que são condições mais frequentes nesse grupo. O feto que apresenta restrição do crescimento tem risco elevado de morbimortalidade, que aumenta com a gravidade da restrição de crescimento (CREASY & RESNIK, 2008).

Os problemas relacionados ao CIUR não terminam no nascimento ou na infância. Em alguns casos, ele tem sido associado ao desenvolvimento de doenças em adultos, fenômeno conhecido como *fetal programming*. Essa associação do programa de má-adaptação com doenças no adulto tem sido descrita por Barker *et al.* (2009) e Lahti *et al.* (2009), que demonstraram que o programa de aceleração de ganho de peso do recém-nascido ao adolescente por aumento de ingestão de alimento, depósito de gordura e, possivelmente,

diminuição do gasto de energia levam esses indivíduos a desenvolverem obesidade e outras síndromes metabólicas devido a alterações nos mecanismos regulatórios homeostáticos.

Nas sociedades ocidentais, a incidência de crianças com baixo peso tem aumentado desde a metade do século XX. Elas vão se tornar mulheres com doenças crônicas, que terão a capacidade reprodutiva reduzida, necessitando de assistência de técnicas de reprodução assistida. Isso aumentará o número de gestações múltiplas com partos pré-termos e fetos com baixo peso (ROSS; BEALL, 2008).

A identificação de mecanismos compensatórios em fetos de crescimento restrito frente a condições hemodinâmicas anormais é uma contribuição para minimizar as complicações perinatais e, assim, reduzir as taxas de morbimortalidade perinatal. Em geral, a taxa de mortalidade para neonatos com CIUR é 50% mais alta do que a de uma população que cresceu normalmente e a mortalidade é mais alta em fetos com CIUR do sexo masculino. Cerca de 30% de todos os natimortos apresentam essa doença. A incidência de sofrimento fetal intraparto é de 25 a 30% em fetos acometidos por crescimento intrauterino restrito (CREASY & RESNIK, 2008).

Entretanto, apesar de compreenderem-se muitos dos mecanismos de como algumas doenças ou situações clínicas maternas podem levar a alterações no crescimento fetal, isto não é o suficiente. Ainda é preciso explicar qual o mecanismo responsável pelo rompimento do processo de crescimento normal e, se possível, identificá-lo precocemente antes da evolução para estágios mais graves que muitas vezes é irreversível.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O desenvolvimento normal do feto depende quase exclusivamente de uma função placentária adequada, possibilitando a realização de suas trocas gasosas e recebendo os nutrientes imprescindíveis ao seu desenvolvimento (NICOLAIDES; ECONOMIDES; SOOTHIL, 1989).

A restrição de crescimento intrauterino é definida como falha em manter o crescimento intrauterino adequado, apesar de que cientificamente essa definição é difícil de ser aplicada na prática, porque não é simples determinar quando o crescimento é adequado. O Colégio Americano de Ginecologistas e Obstetras escolheu definir CIUR como um feto com peso estimado abaixo do percentil 10 para a idade gestacional, uma vez que a mortalidade e a morbidade aumentam quando o peso é abaixo desse percentil (MARI; HALF, 2007).

A restrição do crescimento intrauterino é reconhecida como uma síndrome que compreende feto de tamanho pequeno e também anormalidades metabólicas específicas, incluindo hipoglicemias, hipotermia e policitemia. Vários fatores fetoplacentários e maternos estão relacionados com o CIUR, entre eles anormalidades cromossômicas, síndromes genéticas, doenças fetoplacentárias, hipertensão materna, diabetes complicado, cardiopatias e hemoglobinopatias (CREASY; RESNIK, 2008).

Esse grupo heterogêneo compreende fetos: a) com alto risco de complicações perinatais; b) pequenos por razões genéticas, raciais e usualmente saudáveis ao nascimento; c) com problemas de anormalidades cromossômicas ou congênitas (pequeno grupo). Não está claro se o CIUR simétrico e o assimétrico são duas entidades distintas ou se são reflexos da gravidade do processo de restrição do crescimento, logicamente excluindo-se aberrações cromossômicas e doenças infecciosas (CREASY; RESNIK, 2008).

Além disso, muitos desses estudos sobre CIUR não relatam as diferenças entre fetos pequenos para a idade gestacional constitucionais e patogênicos. No caso destes últimos, tem-se definido fetos com CIUR como um grupo homogêneo, sem diferenciação entre fetos constitucionalmente pequenos ou fetos patológicos. Isso tem criado falta de clareza e

tem impedido o entendimento dos mecanismos em que se baseia o CIUR (MARI; HANIF, 2007).

Os testes utilizados para monitorizar fetos com CIUR são ultrassom com perfil biofísico fetal, dopplerfluxometria e cardiotocografia. Neste estudo será dada ênfase à avaliação com doppler. O emprego do doppler do sistema cardiovascular fetal permite avaliar a redistribuição de fluxo observada nos fetos com CIUR. Esse processo é principalmente caracterizado pelo aumento do índice de pulsatilidade da artéria umbilical e diminuição do índice de pulsatilidade da artéria cerebral média, o que sugere aumento da resistência vascular da artéria umbilical e vasodilatação da cerebral. O importante é que estudos randomizados mostraram baixo número de fetos natimortos em gestações de alto risco quando o estudo de doppler da artéria umbilical é realizado pelo obstetra (MARI; HANIF, 2007).

Fetos pequenos para a idade gestacional têm peso estimado abaixo do percentil 10 e incluem fetos constitucional e patogenicamente pequenos (CIUR). Este trabalho adota o termo “pequeno para a idade gestacional” para todos os fetos pequenos sem doença materna e com doppler de artéria umbilical e cerebral média normal. Fetos com CIUR são pequenos, com doença materna reconhecida ou doppler de artéria umbilical e cerebral média alterado. Quando não existe doença materna, mas as alterações do doppler fetal estão presentes, considera-se feto com CIUR idiopático (MARI; HANIF, 2007).

Insuficiência placentária é resultante da falta de mudanças fisiológicas da invasão trofoblástica das artérias espiraladas ou desenvolvimento anormal dos vilos da árvore vascular. Essa falta de mudanças fisiológicas pode diminuir o fluxo sanguíneo para a placenta. Como a demanda de oxigênio fetal aumenta ou a perfusão diminui, o fornecimento de oxigênio para o sangue fetal na placenta cai a um ponto crítico em que ocorre a redistribuição do fluxo sanguíneo priorizando cérebro, glândulas adrenais e coração. O processo se manifestará primeiro com elevação da razão sistólica/diastólica, depois ausência da velocidade diastólica e, finalmente, velocidade diastólica reversa do feto. A performance cardíaca torna-se comprometida, o que é detectado no fluxo venoso cardíaco (ausência ou fluxo venoso reverso do ducto venoso). E se todas essas alterações do doppler estão presentes, o feto tem risco aumentado de morrer (MARI; HANIF, 2007).

A insuficiência placentária leva a mecanismos compensatórios para manter adequados a oxigenação e o suporte nutricional para os órgãos fetais vitais como coração, cérebro e rim, definidos como centralização de fluxo. Apesar desse mecanismo de adaptação ser o primeiro a ser verificado em fetos que estão expostos a insultos hipóxicos, como verificado por Leite (1998), a persistência dessa alteração pode levar ao comprometimento fetal (CABRAL; AGUIAR; PEREIRA, 1993; MELO, 1992).

A persistência do estado de hipóxia leva o feto a utilizar outras respostas adaptativas, como diminuição dos gastos energéticos e, como consequência, diminuição do ritmo de crescimento e dos movimentos corporais (SCHERJON *et al.*, 1993). O sangue é redistribuído para órgãos centrais, em detrimento de outros tecidos (COHN *et al.*, 1974; PEETERS *et al.*, 1979; REUSS *et al.*, 1982). Mas se a hipóxia tornar-se muito grave, a oxigenação cerebral não pode ser mantida, ocorrendo o óbito fetal ou lesões irreversíveis no cérebro ou coração (THORP; CEFALO, 1990).

A sensibilidade do doppler de artéria uterina neonatal é de 64%, da oligohidramnia de 32%, da alteração do perfil biofísico fetal de 18% e da cardiocografia de 14%. Desta forma, muitos obstetras consideram que fluxo umbilical diastólico reverso abaixo de 32 semanas de gestação e ausência de fluxo com 34 semanas ou mais constituem indicação para interromper a gestação prontamente, em um centro com unidade de cuidados intensivos neonatal. Entretanto, em casos de fluxo diastólico reverso da artéria umbilical antes de 32 semanas de gestação, a abordagem é menos simples (MARI; HANIF, 2007).

Dubinsky *et al.* (1997) enfatizaram resultados insatisfatórios de fetos com peso estimado abaixo do percentil 10 e parto cesariano por sofrimento fetal sem trabalho de parto, morte fetal, hemorragia intraventricular, infarto cerebral, admissão em unidade de cuidados intensivos neonatal por mais de 10 dias, ao termo ou parto pré-termo.

A ausência de centralização de fluxo tem sido considerada um parâmetro para direcionar o momento do parto de fetos com CIUR. Mari e Half (2007) têm demonstrado que fetos com CIUR monitorizados com doppler longitudinal apresentam menos pré-morbidade no sistema vascular do que fetos seguidos até a ocorrência de falência cardíaca ventricular.

Mais recentemente, Hecher *et al.* (1995) salientaram que existe uma sequência temporal do doppler e mudanças biofísicas que precedem as mudanças circulatórias periféricas e centrais de fetos com CIUR grave. Foram avaliados 93 fetos com CIUR com pelo menos três estudos de doppler após o diagnóstico dessa doença, com última mensuração dentro de 24 horas antes do parto ou morte intrauterina. O índice de fluido amniótico e o índice de pulsatilidade da artéria umbilical foram as primeiras variáveis que se tornaram alteradas, seguidas pela alteração no traço da cardiotocografia fetal, índice de pulsatilidade da artéria cerebral média, índice de pulsatilidade aórtica e alteração do ducto venoso.

## 2.1 Sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) clássico é bem conhecido por seu papel regulador da pressão arterial e da homeostase dos fluidos corporais. Nesse sistema, o angiotensinogênio, secretado pelo fígado, é ativado na circulação pela renina produzida nos rins, formando o decapeptídeo angiotensina I (Ang I). No endotélio vascular, a Ang I é convertida pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) ao octapeptídeo angiotensina II, o principal componente biologicamente ativo da cascata do SRA. A ação da Ang II é realizada a partir da sua ligação aos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>. Ao ligar-se ao receptor AT<sub>1</sub> vascular, tubular e glomerular renal, provoca antinatriurese; e ao receptor AT<sub>2</sub> causa aumento da excreção renal de sódio. A Ang II, por seu efeito vasoconstritor potente e proliferativo celular, é considerada um dos mais importantes fatores hipertensivos estudados.

Entretanto, nos últimos anos, devido principalmente ao avanço das técnicas de biologia molecular, tem sido possível demonstrar componentes do SRA em vários tecidos e órgãos, levando ao conceito de SRA tecidual, onde desempenham papéis parácrino-autócrinos. Entre esses órgãos, destacam-se coração, rins, cérebro, testículos, útero e ovários (DZAU, 1988; TRINDER *et al.*, 1992).

A Ang II, o membro mais estudado do SRA, é um octapeptídeo que apresenta potente efeito vasoconstritor, promove apoptose, angiogênese e proliferação celular em diversos tipos celulares (BAKER, ACETO, 1990; DAEMEN *et al.*, 1991; DIMMELER *et al.*, 1997; GOLDENBERG *et al.*, 2001; GRIENDLING *et al.*, 1997). É formada pela ação da ECA sobre a Ang I, com remoção de dois aminoácidos do flanco carboxílico. Atua através de dois receptores situados na membrana celular, o AT<sub>1</sub> e o AT<sub>2</sub>, acoplados a proteína G, sendo que a maioria das ações conhecidas se produz por meio do receptor AT<sub>1</sub> (BERRY *et al.*, 2001; VINSON *et al.*, 1997).

Outros fragmentos de peptídeos do SRA têm sido verificados para a possibilidade de desempenharem funções biológicas, como angiotensina III (Ang 2-8), angiotensina IV (Ang 3-8), angiotensina-(3-7) (SEN; SMEBY; BUMPUS, 1974) e, mais recentemente, a angiotensina-(1-7).

O heptapeptídeo Ang-(1-7) é um membro biologicamente ativo do SRA que tem sido associado à regulação central e periférica da pressão arterial e da homeostase dos fluidos

corporais (CAMPAGNOLE-SANTOS *et al.*, 1989). Schiavone *et al.* (1988) foram os primeiros a evidenciar um papel fisiológico para Ang-(1-7), com a demonstração do estímulo à liberação de vasopressina no eixo hipotalâmico-hipofisário de ratos. De fato, foi encontrada imunorreatividade para Ang-(1-7) em neurônios hipotalâmicos magnocelulares, eminência mediana e pituitária posterior de ratos *sprague-dawley* (WALDMAN *et al.*, 1988), como também em neurônios hipotalâmicos parvocelulares de ratos transgênicos (mRen-2d)27 e sua co-localização com ocitocina e vasopressina (KROB *et al.*, 1998).

Vários trabalhos têm demonstrado as diversas ações da Ang-(1-7), que podem ser similares (SILVA *et al.*, 1993), opostos (MACHADO *et al.*, 1999) ou distintos da Ang II (CAMPAGNOLE-SANTOS *et al.*, 1992; BAI *et al.*, 1996).

O heptapeptídeo Ang-(1-7) tem sido descrito como um importante componente fisiologicamente ativo do SRA, sendo formado no miocárdio humano intacto a partir do metabolismo da Ang II. Está aumentada no coração humano com falência ventricular como resposta à *up regulation* da ECA2, uma das enzimas responsáveis pela sua síntese, a partir da Ang II (ZISMAN *et al.*, 2003), produzida também no endotélio vascular humano (CAMPAGNOLE-SANTOS *et al.*, 1992). No útero, foi constatada sua presença; e o aumento ou diminuição da conversão da Ang I em Ang-(1-7) por alteração da endopeptidase neutra (NEP) parece estar relacionada às ações do estrogênio e da progesterona endógenos (SENANAYAKE *et al.*, 1998).

A Ang-(1-7) pode ser formada pela clivagem da Ang II por prolil-endopeptidase (PEP) e prolil-carboxipeptidase (PCP) e também diretamente de Ang I, por uma via independente da ECA, a partir da clivagem pelas enzimas PEP e NEP (CAMPAGNOLE-SANTOS *et al.*, 1992; IYER *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 1992). Recentemente, foi descoberta outra enzima ativa na cascata, a ECA2, um homólogo da ECA (VALDÉS *et al.*, 2006), que pode formar Ang-(1-7) a partir de Ang II ou a partir da Ang I, pela ação da ECA2 ou da NEP 24.11 (FONTES *et al.*, 2000). Uma vez formada, a Ang-(1-7) pode ser hidrolisada por aminopeptidases (AMP), gerando Ang-(2-7) e Ang-(3-7), ou também pela ECA, gerando Ang-(1-5) (NEVES *et al.*, 1995; WELCHES *et al.*, 1991).

Recentemente, um receptor específico para a Ang 1-7 foi descrito por Ferrario *et al.* (1997). Os receptores do SRA são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G, que possui sete domínios transmembrana. Estes apresentam propriedades

bioquímicas e farmacológicas diferenciadas e as respostas seguem também diferentes vias de sinalização intracelular. Os receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> são bloqueados especificamente pelo losartan e pelo PD123177 e PD123319, respectivamente; e ambos são igualmente bloqueados pela saralasin. Foi demonstrada grande concentração de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) para AT<sub>1A</sub> em fígado, rins, aorta, útero, adrenais, baço, pulmões, ovários e hipotálamo. O mRNA para AT<sub>1B</sub> foi encontrado em pituitária, adrenais, rins, fígado e útero (KAKAR *et al.*, 1992). Pode ser ressaltada também a expressão de receptores AT<sub>2</sub> em miométrio (WHITEBREAD *et al.*, 1989) e ovários (PUCELL *et al.*, 1991).

Em 2003, mostrou-se claramente que a ligação do proto-oncogene *Mas* e a Ang-(1-7) está envolvida nas ações biológicas desencadeadas por esse peptídeo (COSTA *et al.*, 2003). A expressão do receptor *Mas* foi estudada em cérebro de rato, com a técnica de hibridização *in situ*, tendo sido encontrada forte marcação no giro dentado, nas áreas CA3 e CA4, hipocampo tubérculo olfatório, córtex piriforme, bulbo olfatório e marcação fraca a moderada no lobo frontal (BUNNEMANN *et al.*, 1990). Foi também estudado em cérebro e testículo de camundongo, tendo sido relatado que no testículo o RNA mensageiro aumenta marcadamente durante o desenvolvimento do indivíduo (METZGER *et al.*, 1995), aparecendo aos 18 dias de vida e aumentando até seis meses (ALENINA *et al.*, 2002). O receptor *Mas* foi ainda descrito no ovário de ratas (PEREIRA *et al.*, 2005). Foi referido, também, em cultura de células de mamíferos, que o receptor *Mas* pode formar um complexo com o receptor AT<sub>1</sub>, na forma de heterodímero, produzindo efeito inibitório parcial na função do receptor da Ang II (KOSTEINS *et al.*, 2005).

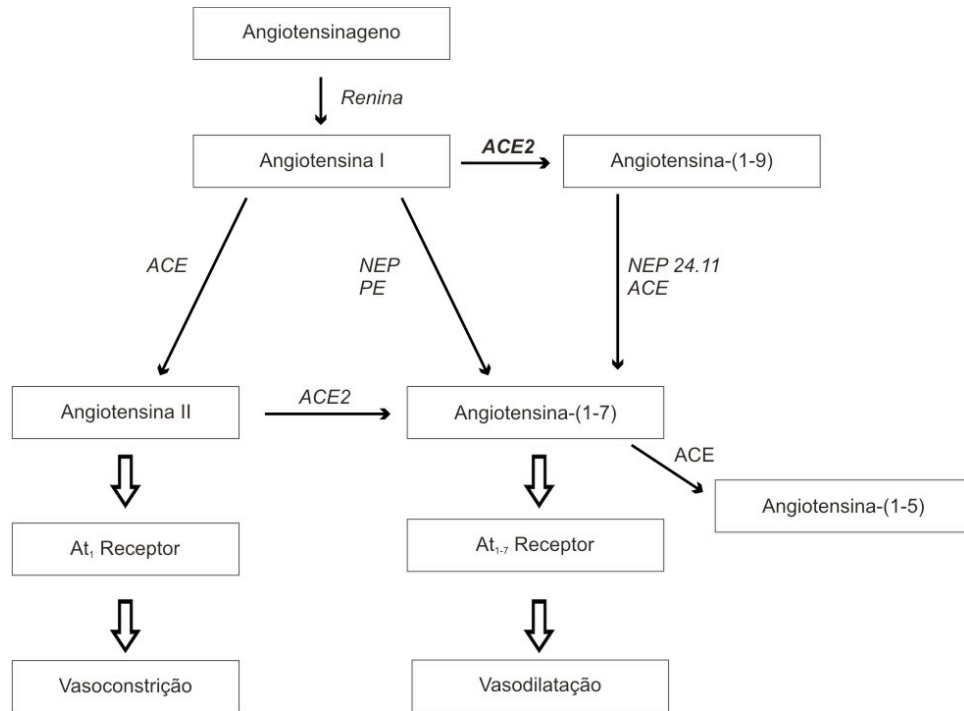


FIGURA 1 - Cascata bioenzimática do sistema renina-angiotensina.

## 2.2 Sistema renina-angiotensina e gestação

O sistema renina-angiotensina tem se mostrado ser a cascata bioenzimática cujo produto bioativo, a Ang II, desenvolve importante papel na regulação da pressão sanguínea, bem como na homeostase de eletrólitos, principalmente o receptor subtipo1 (AT<sub>1R</sub>). Tradicionalmente, o SRA tem sido considerado um sistema endócrino circulante, mas outros estudos (ANTON, L.; BROSNIHAN, 2008; VAZ-SILVA *et al.*, 2008) têm demonstrado sua presença em muitos tecidos como útero, ovário e placenta com ações intrínsecas. A gravidez é uma condição fisiológica caracterizada pelo paradoxo entre progressivo aumento de diferentes componentes do SRA e a manutenção da pressão normal. Thapa, He e Chen (2004) realçaram que o receptor de AT<sub>1R</sub> foi expresso na camada do sinciotrofoblasto e endotélio viloso de placentas a termo. A expressão de AT<sub>1R</sub> é significativamente maior nas pacientes com pré-eclampsia e aumenta com a gravidade da doença. Esses resultados são similares ao proposto por Leung *et al.* (2001), mas conflitantes com os propostos por Knock *et al.* (1994). Valdés *et al.* (2006) demonstraram aumento da expressão do peptídeo Ang-(1-7) na placenta e atribuíram essa condição à manutenção da pressão arterial durante a gestação.

Pesquisas recentes, como a de Anton *et al.* (2008), têm evidenciado que a gestação pode ser uma condição de superexpressão da Ang-(1-7). No terceiro trimestre de uma gestação humana, os níveis plásmaticos de Ang-(1-7) podem aumentar 34%. Uma consideração dessa função foram os níveis reduzidos de Ang-(1-7) no plasma em pacientes com pré-eclampsia, um achado que sugere que a redução desse peptídeo pode contribuir para a elevação da pressão arterial. A excreção urinária de Ang-(1-7) e Ang II durante gestação com pressão normal apresentou progressivo aumento durante a mesma, atingindo níveis 16 a 25 vezes mais altos que durante o ciclo menstrual. Com 35 semanas de gestação, a Ang-(1-7) urinária foi o peptídeo angiotensinogênico predominante, alcançando níveis seis vezes mais altos. Valdés *et al.* (2006) relataram que a expressão de Ang-(1-7) na placenta foi similar em amostras obtidas de gravidez normal a termo e gravidez associada à pré-eclampsia.

Durante a gestação normal, o estrogênio causa a superexpressão do SRA pelo aumento nos tecidos e nos níveis circulantes de angiotensinogênio e renina; conseqüentemente, os níveis de Ang II estão aumentados. Anton *et al.* (2008) descreveram que o SRA do sistema viloso

coriônico é desregulado em mulheres com pré-eclampsia com aumento significativo de Ang II, associado à *up regulation* do mRNAs dos receptores de angiotensinogênio e AT<sub>1</sub>. Com o aumento na Ang-(1-7) e a diminuição modesta do receptor Mas, o balanço de dois peptídeos ativos do SRA foi em direção à Ang II. Os resultados desse estudo comprovaram a maior ação de Ang II, incluindo vasoconstrição, que predominará e poderá contribuir para a fisiopatologia da pré-eclampsia por diminuição das trocas materno-fetais de nutrientes e oxigênio.

Herse *et al.* (2007) elucidaram o SRA na unidade útero-placentária em gestações normais e com pré-eclampsia. Na pré-eclampsia, a expressão do receptor AT<sub>1</sub> é particularmente maior na decídua e autoanticorpos atravessam a barreira placentária.

Em seu trabalho, Itakura e Mizutani (2005) acentuaram que a hipóxia em gestações de pré-eclampsia induz a ativação da enzima conversora de angiotensina na unidade fetoplacentária. Para manter a hemodinâmica fetal, a aminopeptidase A placentária desenvolve a função de barreira entre a mãe e o feto.

### 2.3 Sistema renina-angiotensina e restrição do crescimento fetal

O crescimento intraútero é uma condição complexa que resulta de uma série de inter-relações entre muitos fatores e envolve nutrição materna, ingestão de proteínas, insulina, de crescimento, hormônio de crescimento e tireoidiano. O SRA está contido na placenta e é importante no crescimento fetal, como revelado pela identificação de receptores no trofoblasto (COOPER *et al.*, 1999; LEUNG *et al.*, 2001; LUMBERS, 1995; NIELSEN *et al.*, 2000). O principal componente do SRA na placenta inclui renina, angiotensinas I e II, ECA e receptores de angiotensina (AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>).

Recentes achados sugerem que hipertensão, dislipidemia, diabetes *mellitus*, doença coronariana e morte precoce na vida são mais comuns em adultos que nasceram com restrição de crescimento intraútero (BARKER *et al.*, 2009; LAHTI, J. *et al.* 2009).

Tem-se descrito que o SRA tem função significativa na regulação do fluxo sanguíneo útero-placentário devido à presença de receptores de angiotensina na participação de decidualização, placentação e implantação. Entretanto, relatou-se que esse sistema não apenas regula o fluxo sanguíneo útero-placentário, mas também a síntese de prostaglandinas e excreção de estradiol. Alterações que podem ocorrer no SRA podem levar à diminuição do fluxo sanguíneo placentário, pré-eclampsia e CIUR (KNOCK *et al.*, 1994).

O processo de adaptação de uma vida fetal com restrição de crescimento inclui aumento da ativação do SRA claramente na excreção de angiotensina e destruição da nefrogênese. Além disso, a falta desse processo acarretará hipertensão na vida adulta. Kingdom *et al.* (2002) encontraram concentração de Ang II mais elevada em crianças com CIUR. O aumento de Ang II pode contribuir para a elevação da resistência vascular fetoplacentária observada em gravidez complicada com CIUR (AKISU *et al.*, 2004).

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

Verificar a participação do sistema renina-angiotensina na fisiopatologia da restrição do crescimento intrauterino.

### **3.2 Objetivos específicos:**

3.2.1) Comparar a dosagem dos peptídeos Ang II, Ang 1-7 em sangue materno e no sangue do cordão umbilical em gestações de fetos com CIUR e fetos com crescimento adequado.

3.2.2) Verificar a imunexpressão dos peptídeos Ang II, Ang 1-7, Mas e ECA2, na placenta e no cordão umbilical, comparando fetos com e sem CIUR.

## 4 PACIENTES E MÉTODOS

### 4.1 Pacientes

Foram selecionadas para o estudos gestantes acompanhadas na Maternidade do Hospital das Clínicas (HC) da UFMG e que apresentavam fetos com diagnóstico ultrassonográfico compatível com CIUR. Foi selecionado no mesmo serviço um grupo de fetos com crescimento adequado para a idade gestacional estabelecido como grupo-controle.

Os fetos selecionados como portadores de CIUR foram submetidos ao exame de dopplerfluxometria das artérias cerebral média e umbilical, sendo calculado o índice de pulsatilidade (IP) e determinado o índice umbilico-cerebral (U/C). Definiu-se como centralizados os fetos que apresentaram índice U/C igual ou superior a 1,2.

Após explicação da proposta do trabalho para as gestantes, foram distribuídos formulários para obter o consentimento informado (APÊNDICE A). As pacientes selecionadas que concordaram participaram do estudo.

Após a seleção das pacientes e realização do doppler, os fetos foram divididos em três grupos para a realização de imunoistoquímica:

- Sete fetos PIGs e apresentando centralização de fluxo;
- cinco fetos PIGs sem centralização de fluxo;
- 11 fetos AIG e com índice U/C normal como grupo controle.

Para melhor análise, esses grupos foram subdivididos em dois subgrupos: igual ou inferior a 35 semanas de gestação e acima de 35 semanas de gestação.

Foram excluídos do trabalho fetos de mães portadoras de hemoglobinopatias e doenças do parênquima pulmonar, diabéticas, com gestação múltipla e fetos que apresentaram hidropsia e malformação.

Como caracterização dos grupos e subgrupos em relação a idade materna, pressão arterial média (PAM) e peso fetal demonstramos os gráficos abaixo.

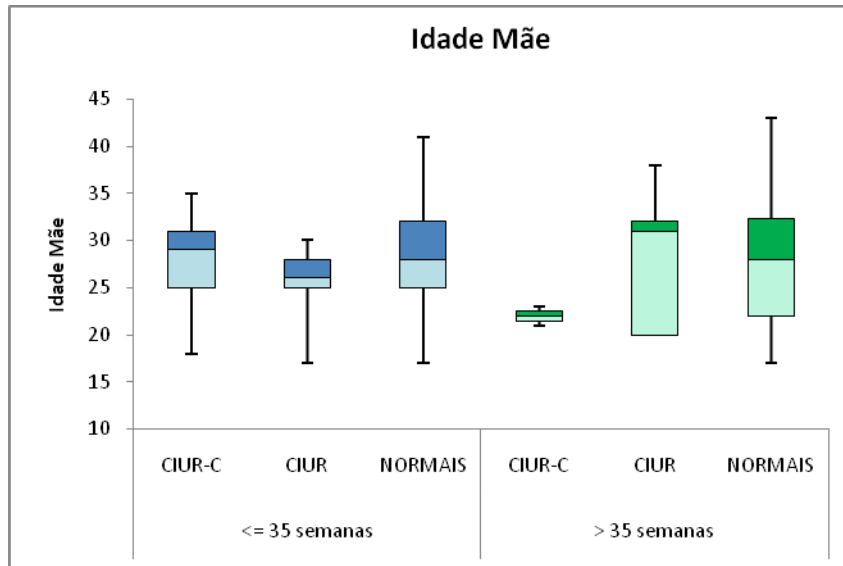


GRÁFICO 18 - Distribuição da idade materna entre os grupos .

## 4.2 Métodos

Os fetos foram definidos como portadores de CIUR a partir de exame de ultrassom realizado em aparelho *Siemens Sono Line Prima*. Foi feita a biometria de ossos longos, do diâmetro biparietal (DBP) e da circunferência abdominal (CA), sendo calculado o peso conforme a fórmula  $(1,4 \times \text{DBP} \times \text{CA} \times \text{F}) \times 200$ . Foram considerados portadores de CIUR os fetos com peso abaixo do percentil 10 para a idade gestacional.

A idade gestacional foi baseada no primeiro dia da última menstruação e confirmada por ultrassom na primeira metade da gestação.

A dopplerfluxometria das artérias umbilical e cerebral média foi realizada em aparelho de ultrassom *Sono Ace 8800 Medison Company Ltd 3.01 Digital Gaya Mt*. Foi insonada inicialmente a artéria cerebral média anterior. Após a localização do cordão umbilical, ele foi insonado próximo da inserção da placenta. Posteriormente à obtenção das medidas, foi determinado o índice U/C, sendo considerado alterado quando acima de 1,2.

Foram avaliados 22 fetos, sendo: sete considerados pequenos para a idade gestacional e com centralização de fluxo, cinco pequenos para a idade gestacional sem centralização de fluxo e 11 adequados para a idade gestacional e com índice umbilico-cerebral normal.

Para a realização do radioimunoensaio foram utilizadas 70 amostras de plasma materno e 22 de plasma fetal, agrupados de acordo com o grupo de origem.

#### **4.2.1 Imunoistoquímica para angiotensina II, angiotensina-(1-7) proto-oncogene *Mas* e enzima conversora de angiotensina II (ECAII)**

Os tecidos fetais (placenta e cordão umbilical) foram colhidos no momento do parto cesariano, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em *freezer* -80°C. Posteriormente, esses tecidos foram embebidos em formol a 10%. Após inclusão em parafina, eles foram seccionados em cortes de 4 µm de espessura, nos quais foi realizada a imunoistoquímica ( fig 2-9). Protocolos semelhantes foram utilizados para os quatro peptídeos – Ang II, Ang-(1-7), ECA – com devidas modificações das diluições do primeiro anticorpo. A técnica utilizada foi a da avidina-biotina-peroxidase, padronizada por Hsu e modificada por Barbosa-Coutinho, utilizando-se *kit Vectastain* (*Vector Laboratories*, Burlingame CA, EUA) contendo anticorpo secundário biotilado universl (anticoelho e camundongo) produzido em equino, soro de equino normal e complexo avidina-biotina-peroxidase. Utilizou-se como cromógeno o DAB [3,3'-diaminobenzidine] (*Sigma Chem. CO*, St Louis, MO, USA) e contracoloração com hematoxilina (*Vetec*).

A avidina é uma glicoproteína presente na clara de ovo de galinha, de alto peso molecular (PM=68.000 D), de caráter básico (ph=10,4), que apresenta forma tetramétrica com quatro subunidades de 128 aminoácidos cada uma, apresentando grande afinidade pela biotina.

A biotina é uma vitamina de baixo peso molecular (PM=244,3 D), hidrossolúvel produzida por bactérias intestinais, presente também no fígado e na gema do ovo. Pode ser ligada covalentemente a carboidratos e proteínas sem interferir nessas moléculas, devido, em parte, ao seu tamanho.

As peroxidases formam um grande grupo de enzimas que participam dos processos de oxidação e redução. A peroxidase utilizada nesse ensaio é uma horseradish peroxidase, enzima de 40kD isolada da planta horseradish, pertencente à família Brassicacea. Apresenta um grupo heme ligado a um átomo de ferro que funciona com um comutador de elétrons.

A reação se processa com a ligação do primeiro anticorpo ao antígeno investigado; e o segundo anticorpo, enquanto a biotina ligada a peroxidase ocupa os três sítios livres da avidina, produzindo efeito amplificador do processo. A introdução do cromógeno 3,3-

diaminobenzidina (DAB) produz uma coloração marrom-amarelado estável, que permite identificar, ao microscópio, os sítios de imunomarcação.

Os anticorpos primários foram produzidos no laboratório de Hipertensão do ICB-UFMG, exceto o anticorpo ECA2 adquirido pela....O anticorpo policlonal para Ang-(1-7) foi feito em coelho, utilizando o imunógeno Ang-(1-7) sintético e não apresenta reação cruzada com outros membros do sistema renina-angiotensina (SIMÕES E SILVA et al., 2004). O anticorpo para o receptor Mas foi produzido em camundongo knockout, utilizando o imunógeno o peptídeo sintético LAEEKAMNTSSR, correspondente à porção amino-terminal do receptor Mas de camundongo (COSTA-GONÇALVES et al., 2007). Esse anticorpo reconhece o receptor Mas humano devido a homologia das seqüências devido à homologia de seqüências entre as duas espécies e é comparável ao anticorpo anti-Mas humano comercialmente disponível (SAMPAIO et al., 2007a).

Para realização da imunistoquímica foi utilizado um protocolo de dois dias.

No primeiro dia realizou-se:

- desparafinização dos cortes com xilol (xilol 1 e 2; 15 minutos cada);
- hidratação nos álcoois (98-90-80-70-50%; 5 minutos cada);
- lavagem em água destilada, por um minuto;
- digestão enzimática com solução de tripsina durante 15 minutos para recuperação dos sítios antigênicos (somente imunocoloração para receptor Mas);
- bloqueio das peroxidases endógenas com metanol associado a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% por 30 minutos;
- lavagem em PBS, 10 minutos;
- incubação com soro normal, para bloqueio de sítios antigênicos inespecíficos: 30 minutos (diluição 1:30);
- incubação com anticorpo primário;

No segundo dia realizou-se:

- lavagem com PBS, 10 minutos;
- incubação com anticorpos secundário (1:200), 30 minutos;
- lavagem com PBS, 10 minutos;
- incubação com complexo AB (1:200 1 hora);
- lavagem com PBS 10 minutos;
- coloração com DAB (3 a 5 minutos);

- lavagem com PBS, 5 minutos;
- contracoloração com hematoxilina (imersão rápida);
- lavagem em água destilada, 5 minutos;
- desidratação em álcoois graduados 950-98%), 5 minutos cada;
- passagem em xilol 3 e 4 , por 5 minutos em cada;
- montagem em lamínula e Entellan.

Como controle negativo foi utilizado os mesmos tecidos placentário e cordão umbilical; e na seqüência do processo de imunistoquímica substituiu-se o primeiro anticorpo por imunoglobulina de coelho não imunizado. O controle positivo foi corte de testículo de camundongo adulto (ALENINA et al ., 2002; METZGER et al ., 19950

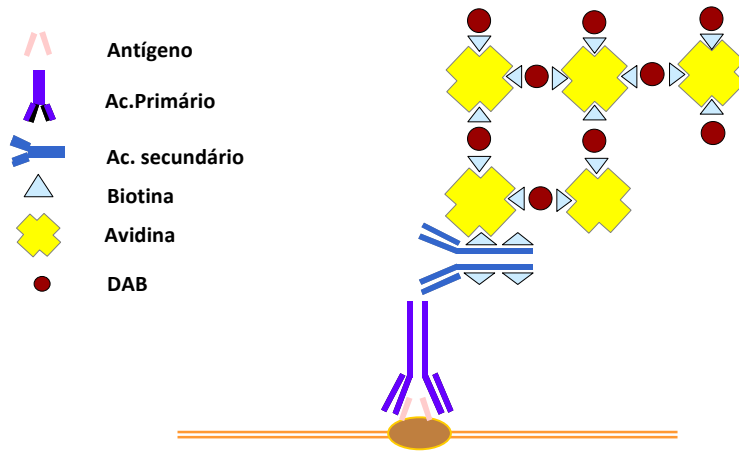
A imunistoquímica mostrou a presença ou não desses peptídeos nos tecidos fetais. Foi realizada análise da graduação de coloração (marcação positiva) nas diversas estruturas celulares desses tecidos, classificadas em fraco, forte e ausente.

**Descritiva: intensidade de marcação:**

- - → **ausente**
- + a ++ → **fraca**
- ++ a +++ → **forte**
- **Marron- DAB**
- **Azul - Hematoxilina**

## IHQ MÉTODO AVIDINA-BIOTINA PEROXIDASE

### Legenda



#### 4.2.2 Radioimunensaio

No momento da cesariana, foram colhidos 10 mL de sangue do cordão umbilical e 10 mL de sangue materno antes da anestesia com coquetel de inibidores. Esse material foi processado (4°C, 4000 rpm, 10 min) e armazenado a -80°C. As amostras de plasma foram extraídas em colunas de *Bond Elut C18* para a obtenção de angiotensinas, mas antes de serem aplicadas na coluna, foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos a -4°C. Após esses procedimentos, o sobrenadante de cada centrifugação foi passado pelas colunas *Bond Elut C18* a partir da adaptação de uma seringa à coluna, o que permitiu a aplicação de pressão positiva.

Foi seguido como protocolo para a extração das angiotensinas:

- pré-ativação das colunas *Bond Elut* a partir da lavagem das mesmas com 10 mL de acetonitrila (ACN) 99,9%/ácido heptafluorobutírico (HFBA) 0,1% e 10 mL de HFBA 0,1%;
- ativação das colunas com 10 mL de ACN 99%/HFBA 0,1% e 10 mL de HFBA 0,1%, seguido sequencialmente de 3 mL de BSA 0,1%/HFBA 0,1%, 10 mL de ACN 10%/HFBA 0,1% e de 3 mL de HFBA 0,1%;
- aplicação da amostra, seguida de 20 mL de HFBA 0,1%, 3 mL de ACN 20%/HFBA 0,1% e 3 mL de ACN 99%/HFBA 0,1%. Este último volume foi coletado em tubos lavados com BSA 0,1%. E liofilizado em centrífuga evaporadora por 40-48 horas até a formação de resíduo, sendo, então, estocado a -20<sup>0</sup> C até a realização do radioimunoensaio (RIE).

Os ensaios foram realizados de acordo com os protocolos adotados pelo Laboratório de Hipertensão do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG (BOTELHO *et al.*, 1994).

#### 4.2.2.1 Radioimunoensaio para Ang-(1-7)

Foram utilizadas as seguintes soluções para determinação dos níveis de Ang-(1-7):

- **Tampão do ensaio:** Tris-HCL 50 mM, solução tampão albumina (BSA) 0,1%, cloreto de sódio (NaCl) 50 mM e azida sódica 0,02%. Primeiramente, esses reagentes foram diluídos em 400 mL de H<sub>2</sub>O deionizada para o ajuste do potencial de hidrogênio (pH) dessa solução para 7,5, com HCl 3 N, seguido de acerto final do volume para 500 mL com o uso de um balão volumétrico.
- **Tampão II:** NaCl 0,9%, BSA 0,1% e ácido acético glacial 0,03%. Os reagentes foram dissolvidos em 500 mL de água deionizada e o volume acertado em balão volumétrico. Essa solução foi usada para reconstituição das amostras e diluição da curva padrão.
- **Anticorpo policlonal:** (1:25.000) - preparado a partir de uma solução estoque com diluição 1:5.000 em tampão do ensaio. Esse anticorpo foi diluído em tampão do ensaio para obter solução final na diluição 1:25.000 e apresenta menos que 0,001% de reatividade cruzada com a Ang I e com a Ang II, 0,01% de reatividade cruzada com a Ang-(2-7) e com a Ang-(3-7), 0,08% de reatividade cruzada com a Ang-(4-7) e 0,005% com a Ang-(1-5).
- <sup>125</sup>I|**Ang-(1-7):** marcada, purificada e diluída em tampão do ensaio, para uma concentração final de 6.000 para cada 0,1 mL.
- **Padrões:** foram utilizadas as concentrações-padrão de 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 pg/0,1 mL, diluídas em tampão II da Ang II com o uso de balão volumétrico, preparadas a partir de uma solução estoque de 2 mg/mL.
- **Suspensão de carvão:** a adição de solução de carvão ativado-dextran após 18-22 horas de incubação promoveu a separação do peptídeo ligado ao anticorpo do peptídeo livre. Essa solução foi obtida pela mistura de 0,0625 mg de dextran e 0,6250 mg de carvão ativado para cada 100 mL de tampão do ensaio. A suspensão foi mantida sob agitação constante, em banho de gelo por 1 hora antes do uso.

A técnica utilizou o seguinte protocolo em cada ensaio da Ang-(1-7), com a adição das respectivas soluções em cada tubo, de acordo com o QUADRO 1.

QUADRO 1  
Soluções e volumes utilizados para RIE de Ang-(1-7).

Soluções (µL)	Total	Branco	Po	Padrão	Amostra
Solução II	-	100	100	-	-
Tampão do ensaio	1.300	200	100	100	100
Pontos da curva	-	-	-	100	-
Amostra	-	-	-	-	100
<sup>125</sup> I-Ang-(1-7)	100	100	100	100	100
Anticorpo	-	-	100	100	100
Volume final	1.400	400	400	400	400

Após a adição das soluções nos tubos, estes foram agitados em vórtex e incubados por 18-22 horas. Depois desse período foi adicionado 1 mL de suspensão de carvão em todos os tubos, exceto no tubo total, seguido de centrifugação a 2.500 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e sua radioatividade contada no contador gama.

#### 4.2.2.2 Radioimunoensaio para Ang II

Foram utilizadas as seguintes soluções para determinação dos níveis de Ang II:

- **Tampão I da Ang II:** tris-HCL 0,1 M, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 15 mM e lysozima 0,1%. O pH foi acertado para 7,4 com HCl 3 N e volume completado para 500 mL em balão volumétrico com água deionizada.
- **Solução II:** NaCl 0,9%, BSA 0,1% e ácido acético glacial 0,03%. Os reagentes foram dissolvidos em água deionizada e o volume final de 500 mL dessa solução foi acertado em balão volumétrico. Essa solução foi usada para a reconstituição das amostras e diluição da curva-padrão.
- **Anticorpo policlonal 1:50.000:** preparado a partir de uma solução-estoque com diluição 1:25.000 em tampão I da Ang II. Esse anticorpo foi novamente diluído em

tampão I da Ang II para obter uma solução final na diluição de 1:50.000 e apresenta menos de 0,001% de reatividade cruzada com a Ang I e com a Ang-(1-7), 0,002% de reatividade cruzada com a Ang-(1-9) e 100% de reatividade cruzada com a Ang-(2-8), Ang-(3-8) e Ang-(4-8).

- <sup>125</sup>I|Ang II: marcada, purificada e diluída em tampão I da Ang II para uma concentração final de 6.000 cpm para cada 0,1 mL.
- **Padrões:** as concentrações dos padrões utilizados foram de 80, 40, 20, 10, 5 e 2,5 pg/0,2 mL de Ang II em solução II preparados a partir de uma solução estoque de 2 µg/mL de Ang II diluídos em água deionizada.
- **Suspensão de carvão:** a separação do peptídeo ligado ao anticorpo do peptídeo livre foi feita de maneira semelhante à da Ang-(1-7).

Foi utilizado o seguinte protocolo em cada ensaio da Ang II, com a adição das respectivas soluções em cada tubo, de acordo com o QUADRO 2:

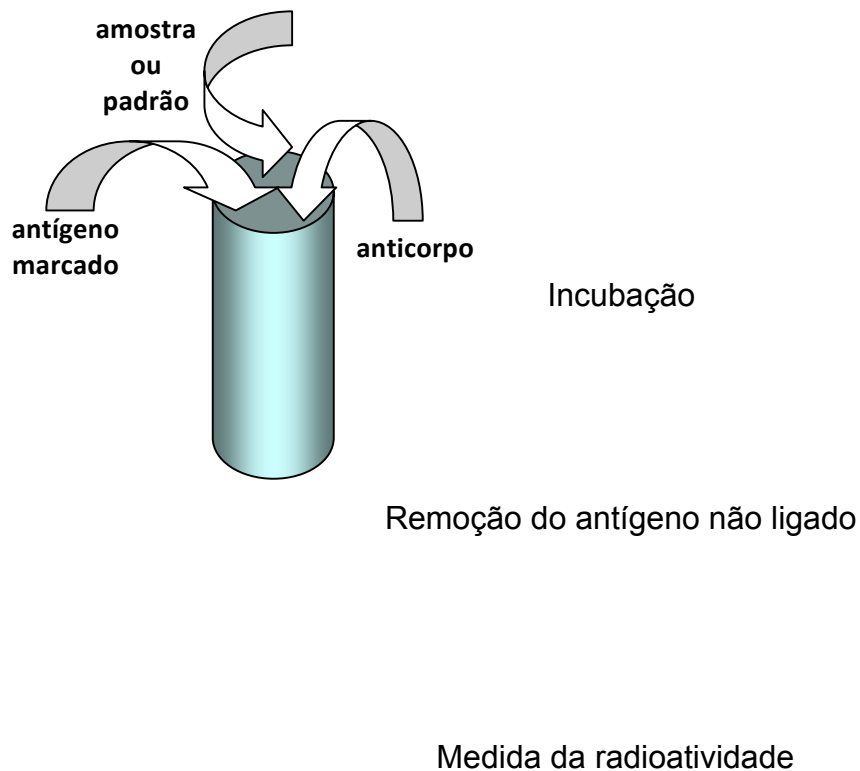
QUADRO 2

Soluções e volumes utilizados para RIE de Ang II

Soluções (µL)	Total	Branco	Po	Padrão	Amostra
Tampão I da Ang II	1.100	100	-	-	-
Tampão II	200	200	200	-	100
Pontos da curva	-	-	-	200	-
Amostra	-	-	-	-	100
<sup>125</sup> I Ang II	100	100	100	100	100
Anticorpo	-	-	100	100	100
Volume Final	1.400	400	400	400	400

Os tubos foram agitados em vórtex após a adição das respectivas soluções, seguido de incubação por 18-22 horas a 4°C. Após esse período, foi adicionado 1 mL de suspensão de carvão em todos os tubos, com exceção do tubo total, e centrifugação a 2.500 rpm por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e sua radioatividade contada no contador gama.

## Radioimunoensaio



## 5 RESULTADOS

PRECISA COLOCAR ESTE INÍCIO, ISTO NÃO É METODOLOGIA?

Foram estudados os seguintes parâmetros nos grupos em estudo:

- Dosagem por meio de radioimunoensaio dos peptídeos Ang II e Ang 1-7 em sangue materno e sangue de cordão umbilical de fetos com restrição de crescimento e adequados para a idade gestacional;
- Localização dos peptídeos Ang II, Ang 1-7, ECA2 e receptor MAS em placenta e cordão umbilical de fetos com restrição de crescimento e adequados para a idade gestacional.

### 5.1 RESULTADOS IMUNOISTOQUÍMICA

Neste estudo observou-se a marcação dos peptídeos no endotélio principalmente da veia umbilical. Em relação à placenta, verificou-se marcação citoplasmática das células do sinciotrofoblasto e a expressão também é dependente da idade e do crescimento do feto.

## 5.1.2 Localização da Ang 1-7 na placenta

Na placenta ocorreu marcação da Ang 1-7 fraca a forte no citoplasma das células do sinciciotrofoblasto, sendo a marcação forte principalmente nos fetos adequados para a idade gestacional acima de 35 semanas.

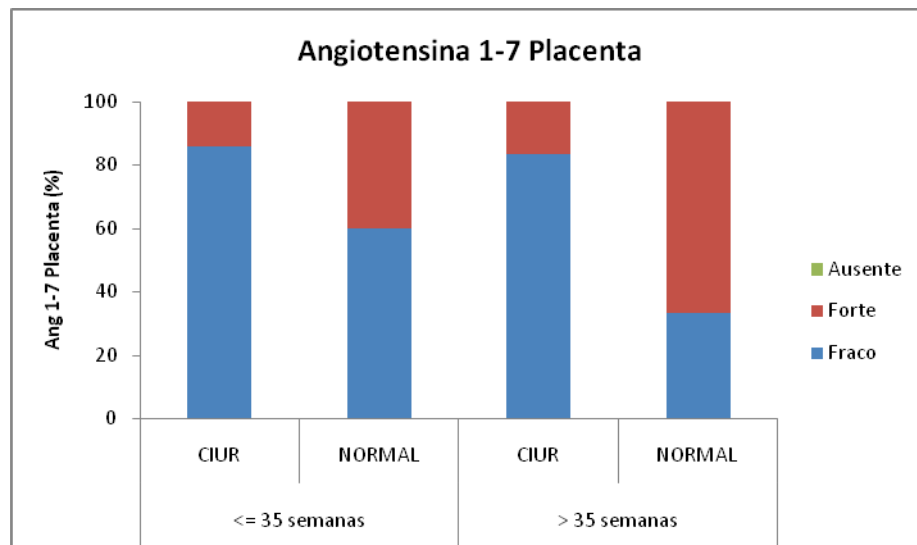


GRÁFICO 1 - Distribuição de angiotensina-(1-7) placenta entre os grupos.

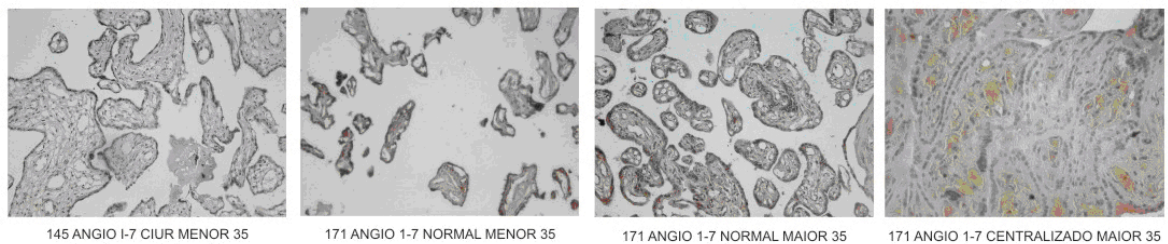
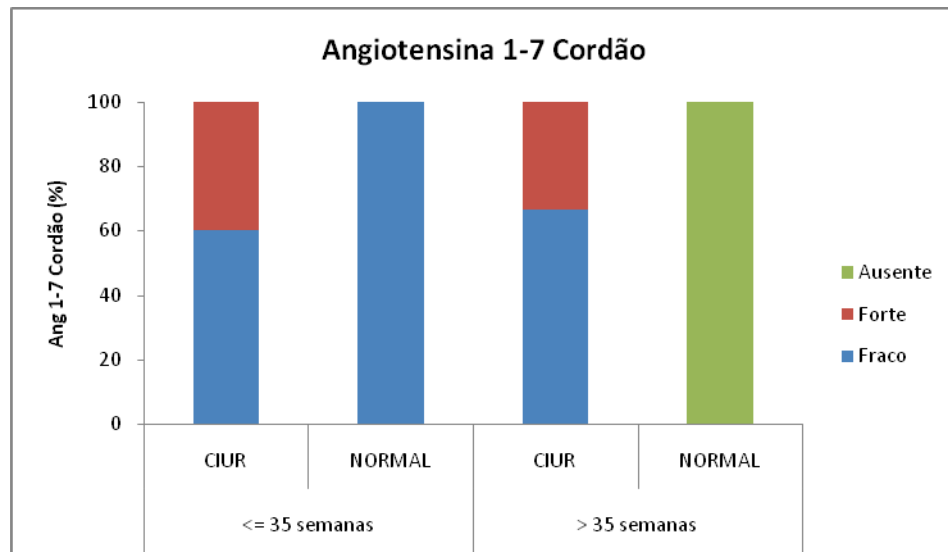


FIGURA 2 - Lâminas de Angiotensina (1-7) placenta

### 5.1.3 Localização da Ang 1-7 no cordão umbilical

No cordão ocorreu os três tipos de marcação da Ang 1-7 principalmente no endotélio da veia umbilical, sendo ausente nos fetos adequados para a idade gestacional acima de 35 semanas.



coluna2/lâmina4, coluna3/lâmina4,coluna4/lâmina4.

GRÁFICO 2 - Distribuição de angiotensina-(1-7) no cordão entre os grupos.

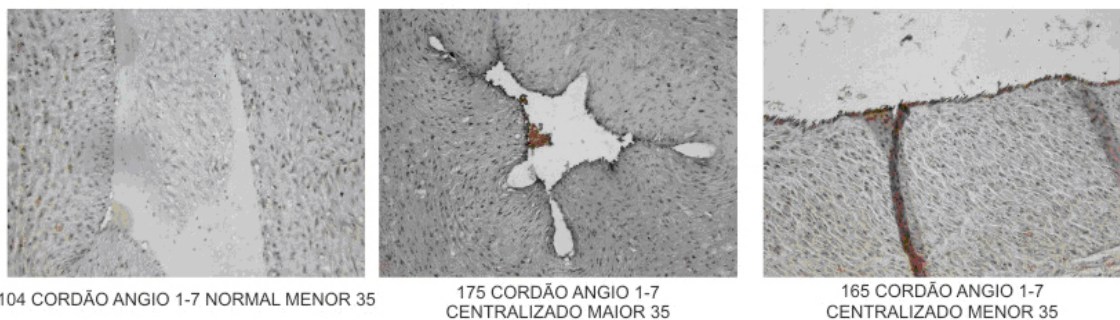
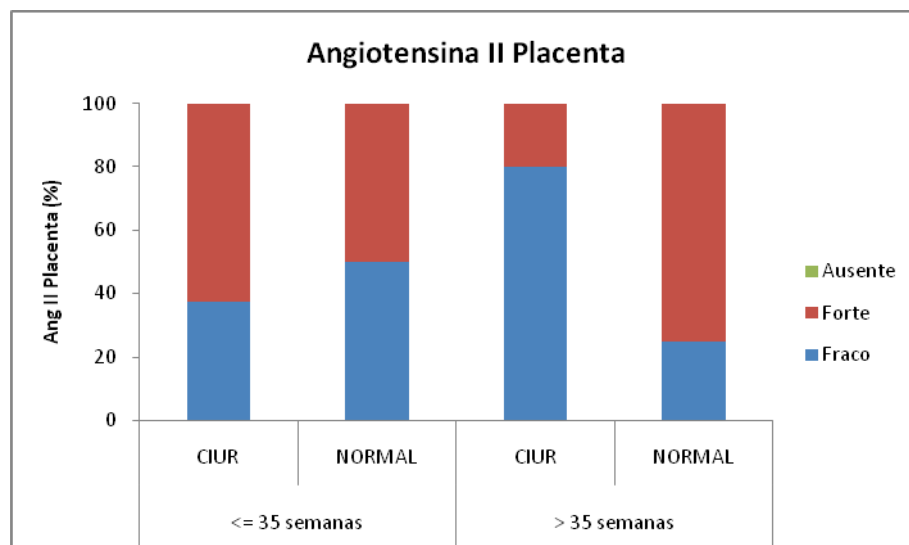


FIGURA 3 - Lâminas de Angiotensina (1-7) cordão

### 5.1.4 Localização da Ang II na placenta

Na placenta ocorreu marcação da Ang II fraca a forte no citoplasma das células do sinciciotrofoblasto, sendo a marcação forte principalmente nos fetos CIUR abaixo de 35 semanas e adequados para a idade gestacional acima de 35 semanas.



coluna1/lâmina2, coluna4/lâmina2,coluna2/lâmina3, coluna1/lâmina3.

GRÁFICO 3 - Distribuição de angiotensina II na placenta entre os grupos.

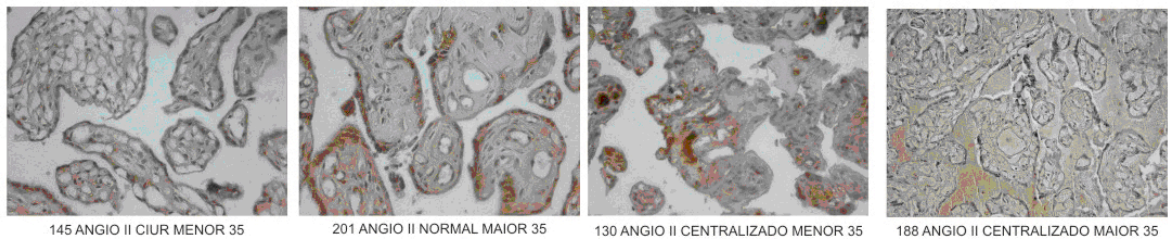
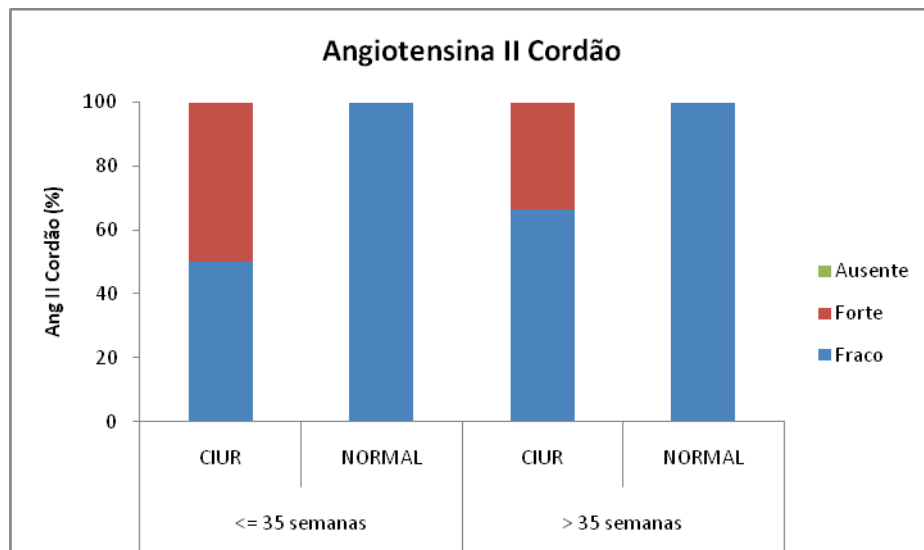


FIGURA 4 - Lâminas de Angiotensina II placenta

### 5.1.5 Localização da Ang II no cordão umbilical

No cordão ocorreu marcação predominantemente fraca da Ang II principalmente no endotélio da veia umbilical, sendo sua expressão mais forte no grupo de fetos com CIUR abaixo de 35 semanas.



4 lâminas da primeira linha.

GRÁFICO 4 - Distribuição de angiotensina II no cordão entre os grupos.

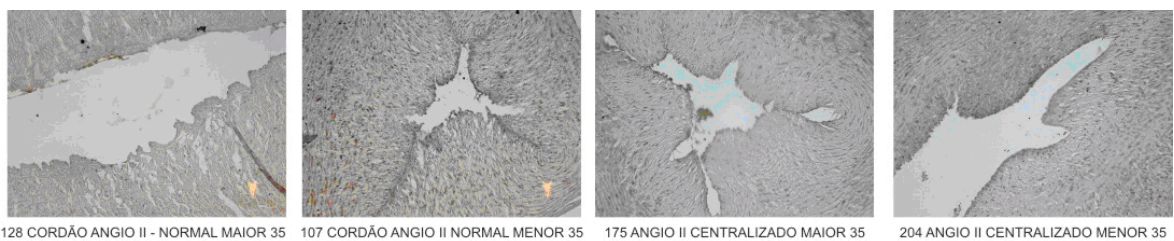


FIGURA 5 - Lâminas de Angiotensina II cordão

### 5.1.6 Localização do receptor Mas na placenta

Na placenta ocorreu marcação do receptor Mas fraca a forte no citoplasma das células do sinciciotrofoblasto, sendo a marcação forte somente nos fetos adequados para a idade gestacional abaixo de 35 semanas.

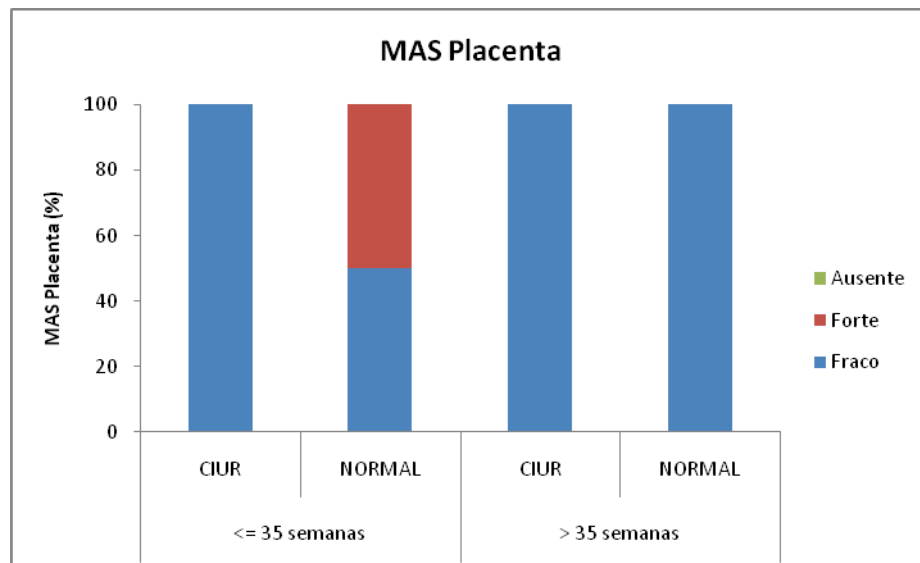


GRÁFICO 5 - Distribuição do *MAS* na placenta entre os grupos.

### 5.1.7 Localização do receptor Mas no cordão umbilical

No cordão ocorreu os três tipos de marcação do receptor Mas no endotélio da veia umbilical, sendo sua expressão mais forte no grupo de fetos com CIUR acima de 35 semanas e ausente no grupo adequado para a idade gestacional acima de 35 semanas..

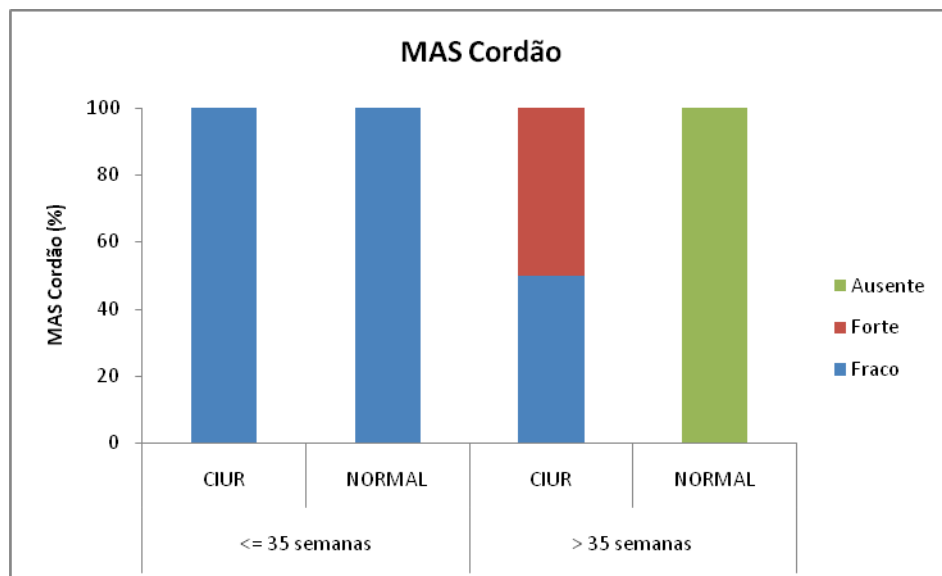
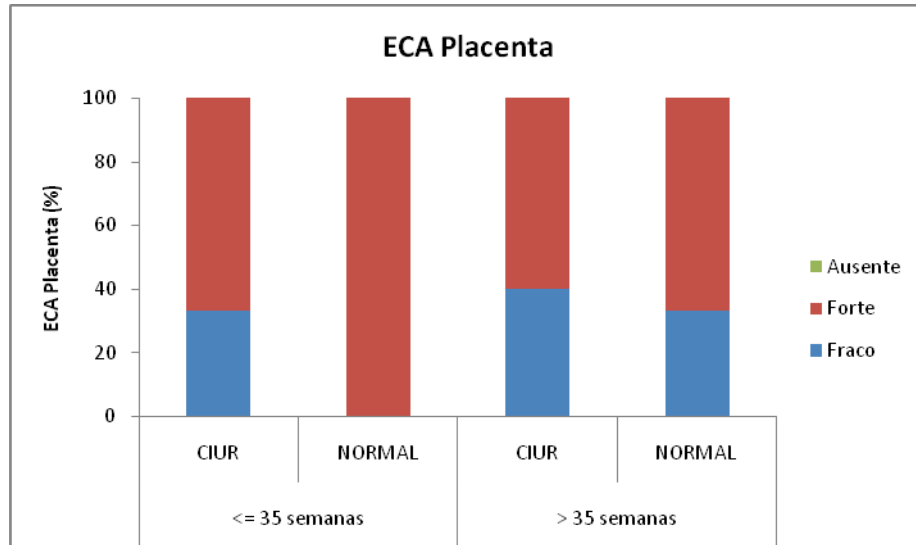


GRÁFICO 6 - Distribuição de *MAS* no cordão entre os grupos.

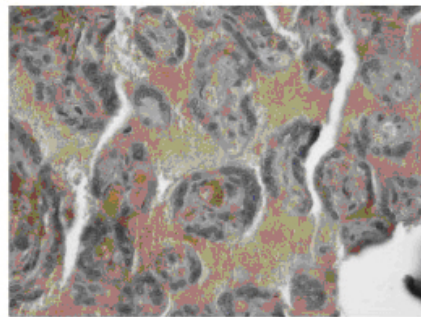
### 5.1.8 Localização da ECA2 na placenta

Na placenta ocorreu marcação fraca a forte da ECA2 no citoplasma das células do sinciciotrofoblasto, sendo a marcação forte principalmente nos fetos adequados para a idade gestacional abaixo de 35 semanas.

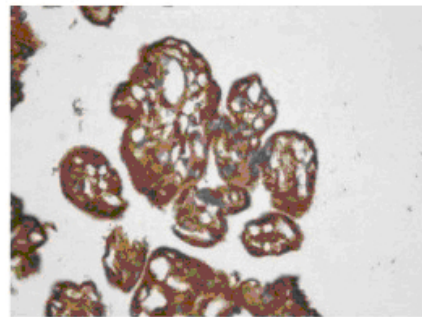


lâminas 1 e 2 da última linha.

GRÁFICO 7 - Distribuição de ECA na placenta entre os grupos.



211 PLACENTA ECA 21+

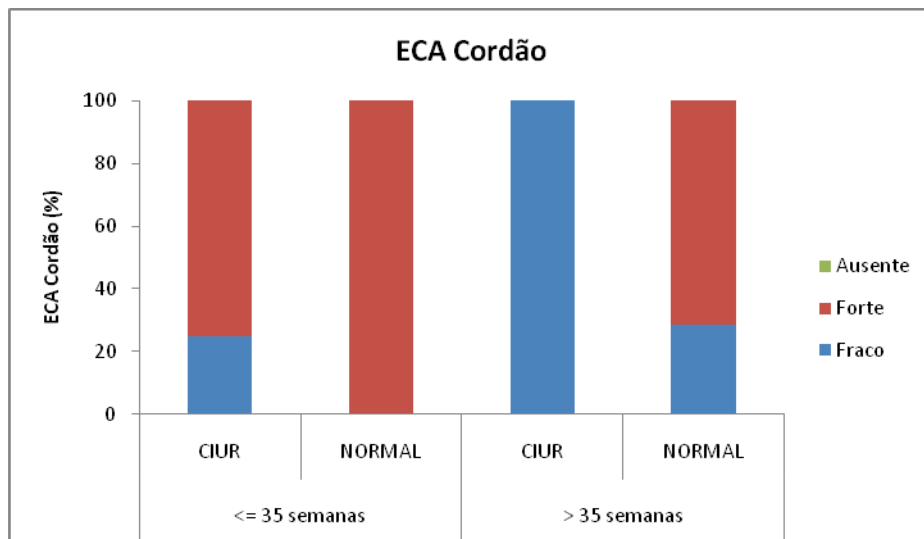


195 ECA2 PLACENTA 4+

FIGURA 8- Lâminas de ECA placenta

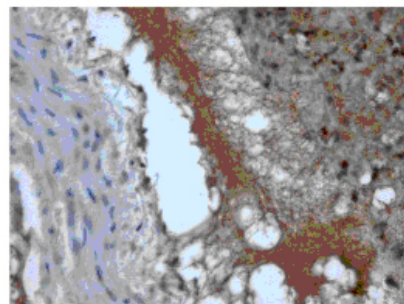
### 5.1.9 Localização da ECA2 no cordão umbilical

No cordão ocorreu marcação fraca a forte da ECA2 no endotélio da veia umbilical, sendo sua expressão mais forte no grupo de fetos adequados para a idade gestacional abaixo de 35 semanas

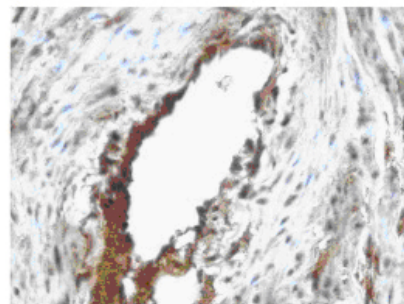


lâminas 3 e 4 da última linha.

GRÁFICO 8 - Distribuição de ECA no cordão entre os grupos.



101 ECA 2 CORDÃO 1+



105 CORDÃO ECA 2 4+

FIGURA 9 - Lâminas de ECA cordão

## 5.2 RESULTADOS RADIOIMUNOENSAIO

Em relação ao radioimunoensaio, nossos resultados mostraram apenas diferenças significativas para os grupos e subgrupos estudados em relação à Ang 1-7. A concentração de Ang 1-7 no sangue materno é mais elevada no subgrupo de fetos com CIUR abaixo de 35 semanas.

Observando-se o teste de normalidade, verifica-se que apenas as variáveis “Ang II feto” e “Ang-(1-7) feto” apresentaram comportamento normal em ambos os grupos. Desta forma, realizou-se o teste paramétrico t-Student bilateral, de comparação entre grupos para ambas. Para as variáveis que não apresentaram normalidade, foi adotado o teste não-paramétrico de *Mann-Witney* bilateral.

Variável	<= 35 semanas		> 35 semanas		Teste Utilizado
	CIUR	Normal	CIUR	Normal	
Angiotensina II Mãe		0,05		0,33	Mann-Witney
Angiotensina II Feto		0,24		0,55	T-Student
Angiotensina 1-7 Mãe		0,03		0,88	Mann-Witney
Angiotensina 1-7 Feto		0,09		0,12	T-Student

Os testes de comparação entre grupos evidenciaram que apenas na variável “Ang-(1-7) mãe” os grupos CIUR e normais apresentaram valores médios diferentes. A fim de se constatar qual grupo apresentou valores mais altos para a variável, procedeu-se ao teste unilateral não-paramétrico de *Mann-Witney*.

Variável	Comparação	P-valor	Teste Utilizado
Angiotensina 1-7 Mãe <=35 semanas	CIUR > Normal	0,98	Mann-Witney

De acordo com o resultado do teste, a 5% de significância, não se rejeitou que o grupo CIUR apresentasse valores para a variável “Ang-(1-7) mãe” mais elevados que o grupo normal.

Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos de fetos com ou sem centralização de fluxo e fetos com crescimento adequado abaixo ou acima de 35 semanas em relação aos níveis de Ang II no plasma materno.

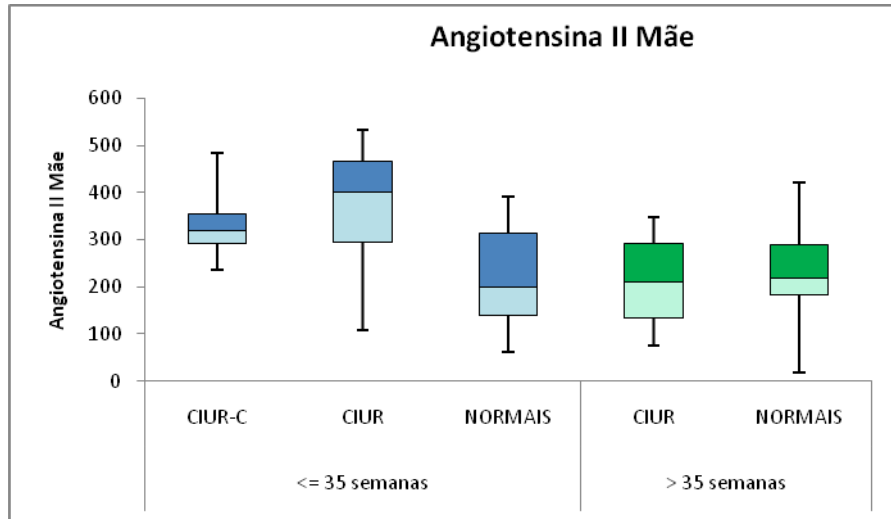


GRÁFICO 9 - Concentração de angiotensina II mãe.

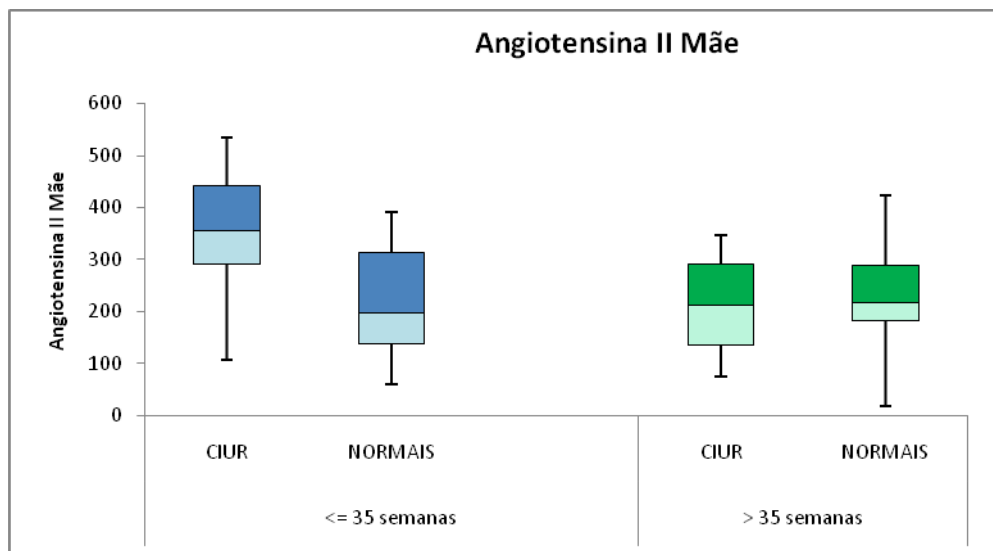


GRÁFICO 10 - Agrupamento dos casos de CIUR para angiotensina II mãe.

Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos de fetos com ou sem centralização de fluxo e fetos com crescimento adequado abaixo ou acima de 35 semanas em relação aos níveis de angiotensina II no plasma fetal.

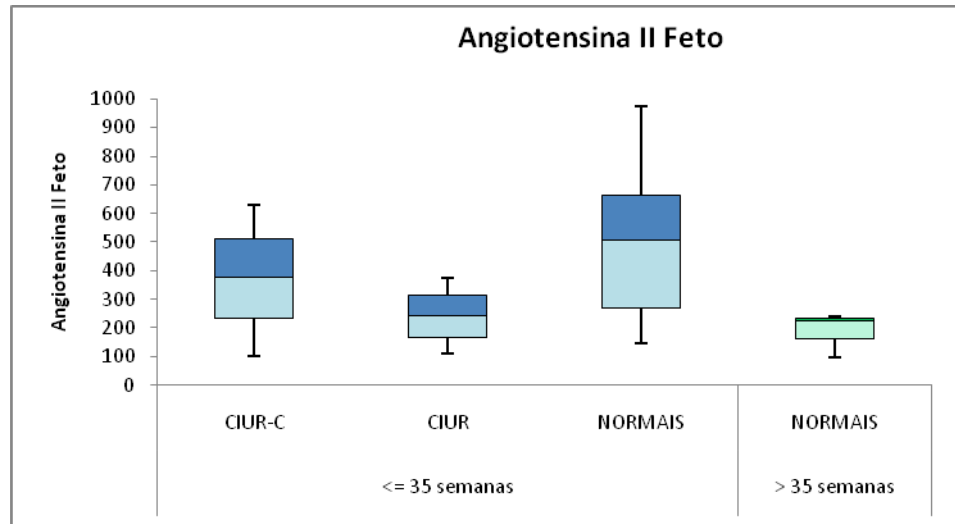


GRÁFICO 11- Concentração de angiotensina II feto.

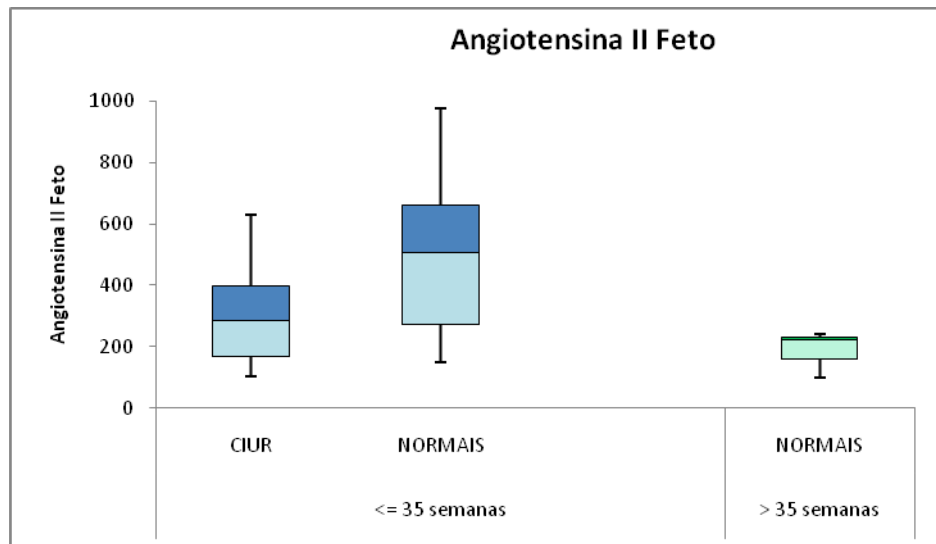


GRÁFICO 12 - Agrupamento dos casos de CIUR para angiotensina II feto.

Ocorreu diferença estatística significativa entre os grupos de feto com CIUR e AIGs em relação à Ang-(1-7) mãe abaixo de 35 semanas, separando ou não fetos com e sem centralização de fluxo.

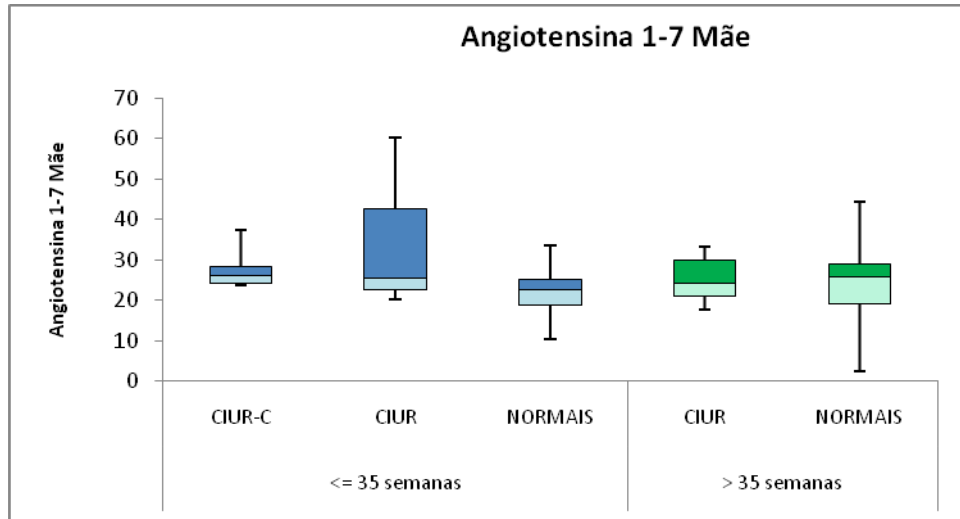


GRÁFICO 13 - Angiotensina-(1-7) mãe.

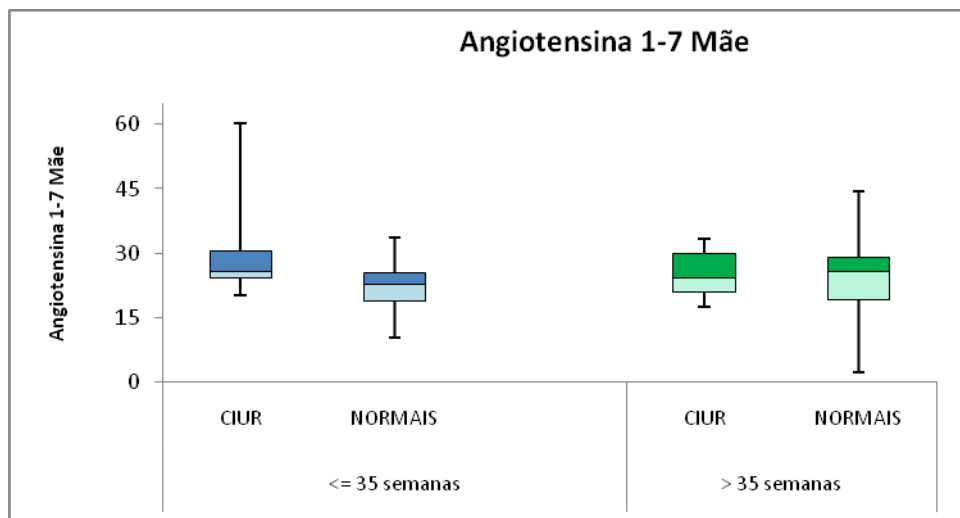


GRÁFICO 14 - Agrupamento dos casos de CIUR para angiotensina-(1-7) mãe.

Não se registraram diferenças estatísticas significativas entre os grupos de fetos com ou sem centralização de fluxo e fetos com crescimento adequado abaixo ou acima de 35 semanas em relação aos níveis de angiotensina-(1-7) plasma fetal.

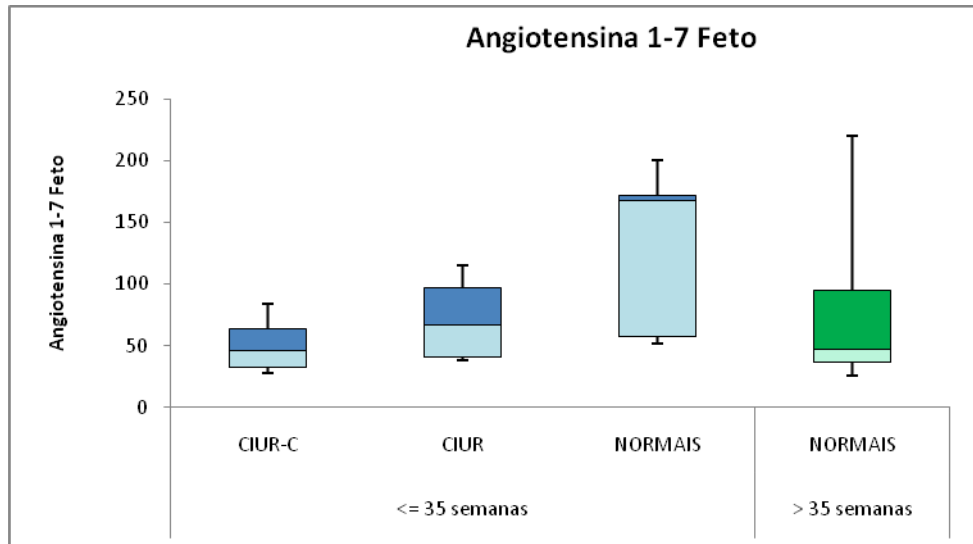


GRÁFICO 15 - Angiotensina-(1-7) feto.

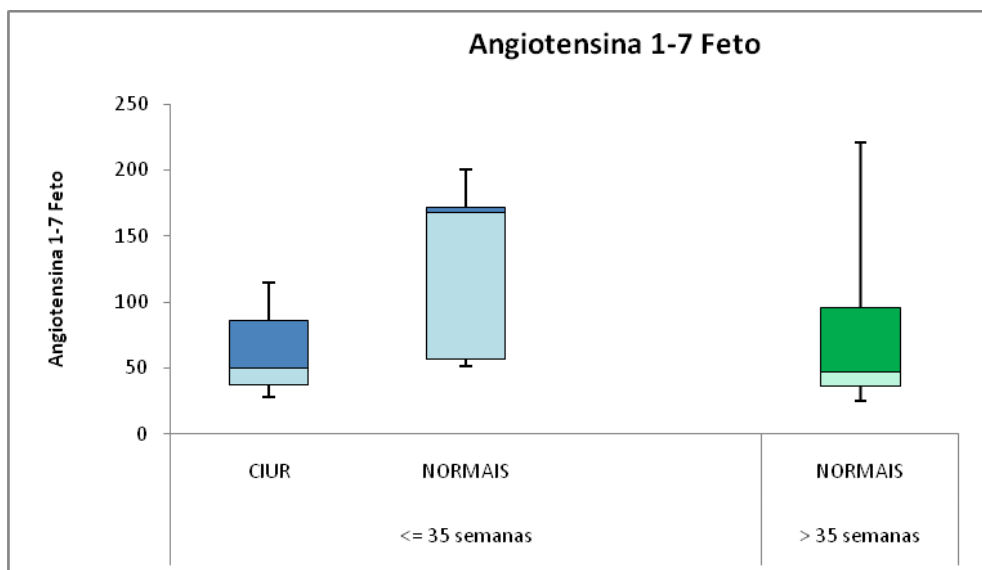


GRÁFICO 16 - Agrupamento dos casos de CIUR para angiotensina-(1-7) feto.

### 5.2.1 Análise de correlação

Esta seção busca quantificar a relação existente entre as variáveis: “peso”, “Apgar 5”, “U/C”, “ph”, “excesso de base (Be)”, “pressão arterial média (PAM)”, “hipertensão arterial crônica (HAC)”, “angiotensina II mãe”, “angiotensina II feto”, “angiotensina-(1-7) mãe” e “angiotensina-(1-7) feto”, com a variável “U/C” somente para os fetos classificados como CIUR-C ou CIUR, chamados de CIUR. Para isso, foram elaborados gráficos de dispersão para as variáveis e calcularam-se os coeficientes de correlação entre elas.

Para definir qual coeficiente de correlação deveria ser utilizado (*Pearson* ou *Spearman*), deve-se conhecer primeiramente a distribuição dos dados. Quando os dados são provenientes de uma distribuição normal, devem ser adotadas as ferramentas da estatística paramétrica, neste caso o coeficiente de correlação de *Pearson*. Por outro lado, se os dados não são normalmente distribuídos, a estatística não-paramétrica se torna mais poderosa, devendo ser usado o coeficiente de correlação de *Spearman*.

Para testar se os dados são normalmente distribuídos, foi utilizado o teste de *Shapiro Wilk*, obtido por meio do *software* R (versão 2.8.0), cujos resultados são apresentados a seguir.

No entanto, como todas as variáveis foram comparadas com a variável “U/C”, que não possui distribuição normal, foi empregado o coeficiente de correlação de *Spearman* em todas as análises.

Não foi observada correlação positiva ou negativa. No grupo de dosagem de fetos isso ocorreu muito provavelmente devido ao pequeno número de casos, sendo verificada uma tendência a correlação inversamente proporcional ente a concentração de Ang 1-7 fetal e o índice U/C.

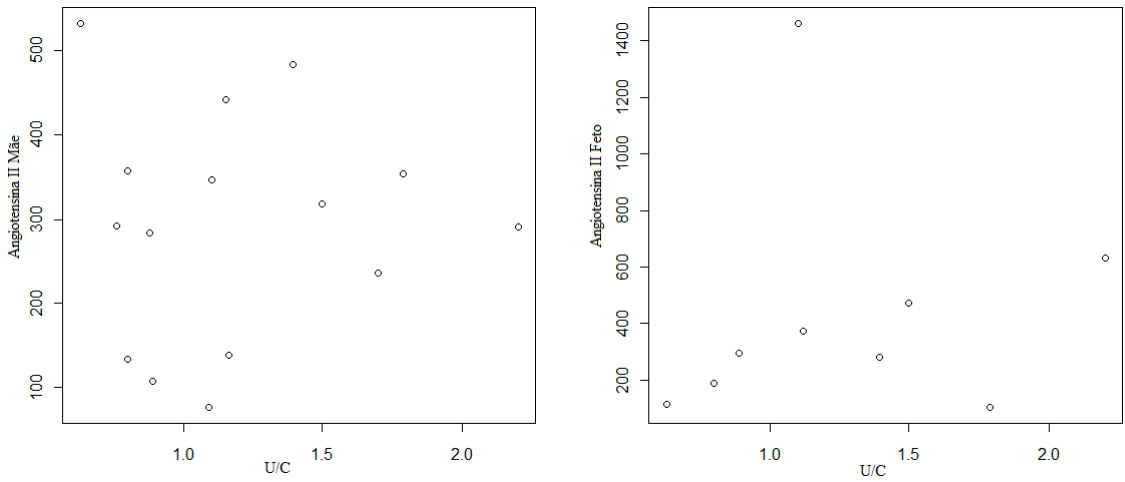


GRÁFICO 17a - Dispersão para todas as variáveis *versus* U/C dos fetos com CIUR.

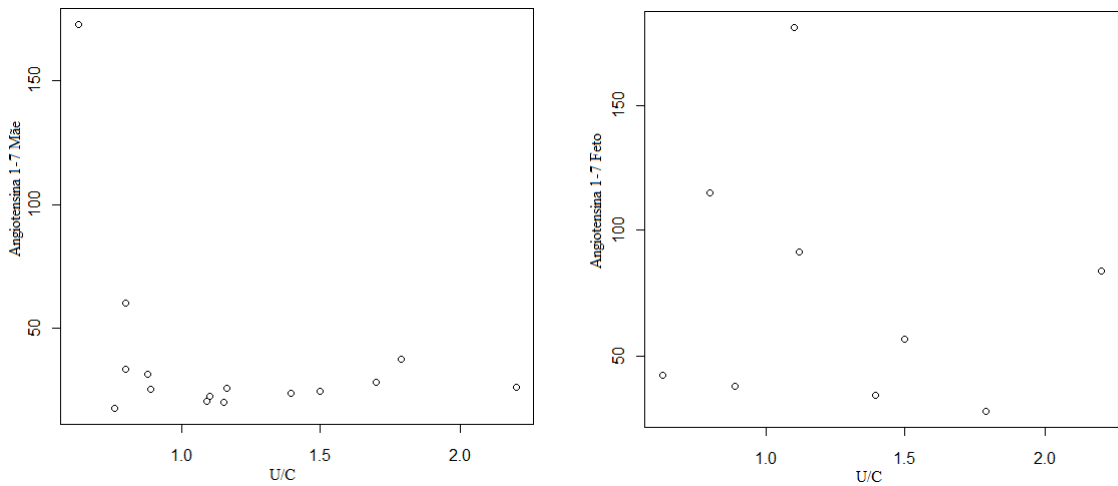


GRÁFICO 17b - Dispersão para todas as variáveis *versus* U/C dos fetos com CIUR.

## 6 COMENTÁRIOS

O estudo da fisiologia fetal torna-se imprescindível a cada dia, sendo que hoje compreendemos muitas das limitações das pesquisas realizadas antigamente com modelos animais e que não apresentavam o que realmente ocorria no ser humano. Compreender as alterações fisiológicas e patológicas que ocorrem na vida fetal é cada vez mais importante, principalmente nas situações de crescimento intra-uterino restrito devido ao elevado número de casos e aos custos extremamente elevados do tratamento intensivo dos recém-nascidos que apresentam este quadro, que em muitas vezes se apresentam prematuros.

A facilidade de se realizar ultrassonografia durante o pré-natal tem permitido diagnosticar fetos com restrição do crescimento e acompanhá-los, procurando definir o momento da interrupção da gestação. Mas ainda não é possível se restabelecer o seu ritmo de crescimento normal, evitando desta forma a prematuridade. O conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos do CIUR pode no futuro apresentar possibilidades de este tratamento venha a ser empregado.

O sistema renina-angiotensina (SRA) tem se mostrado ser a cascata bioenzimática cujo produto bioativo, a angiotenina II (Ang II), desenvolve importante papel na regulação da pressão sanguínea bem como na homeostase de eletrólitos. O SRA tem sido considerado um sistema endócrino circulante, mas diversos autores têm demonstrado a sua presença em muitos tecidos como útero, ovário e placenta, com ações intrínsecas.

A gravidez é uma condição fisiológica caracterizada pelo paradoxo entre o aumento progressivo de diferentes componentes do SRA e a manutenção da pressão normal. As consequências fisiológicas de ativação do SRA durante a gestação ainda não foram completamente esclarecidas.

Buscamos neste estudo, seguindo uma das linhas de pesquisa desenvolvidas no Centro de Medicina Fetal do HC/UFMG com participação do Laboratório de Fisiologia do ICB/UFMG tentar compreender como se comporta o SRA em fetos com restrição de crescimento intra-uterino.

As limitações deste trabalho refletem as dificuldades em se realizar pesquisa com fetos prematuros e com restrição de crescimento intraútero. Fenômenos bioquímicos e enzimáticos são complexos, dinâmicos e as manifestações clínicas transcendem as relações simples de causa e efeito. Cada momento é precioso para a mãe que apresenta intercorrências na gestação e principalmente para o feto.

A simples decisão de interromper a gestação não soluciona o problema do binômio mãe-filho. O resultado obstétrico desfavorável é muitas vezes devastador para a mãe que teve sua condição hemodinâmica estabilizada. Tentar entender esse processo e intervir antes que a restrição de crescimento avance torna-se um desafio para a obstetrícia atual.

O peso ao nascimento é usado como medida do crescimento fetal na gestação, mas não indica se todo potencial de crescimento foi alcançado. Por exemplo, a restrição do crescimento pode resultar de um desenvolvimento placentário deficiente desde o início da gestação, levando a um suporte nutricional inadequado e à cronicidade da restrição do crescimento. Mas, pode-se ter períodos agudos de redução do suporte nutricional, com consequências graves para o crescimento fetal, verificados no final da gestação.

Acredita-se que uma alteração no balanço do sistema renina-angiotensina possa provocar um desvio para a maior produção de peptídeos vasoconstritores, que levariam à vasoconstrição de vasos placentários e, assim, à redução do fluxo para o feto, acarretando a restrição do crescimento intraútero.

Provavelmente, as repostas adaptativas fetais para insultos diferentes, crônicos ou agudos que vão resultar num mesmo déficit de peso verificados ao ultrassom e no momento do nascimento não conduzirão às mesmas respostas. Essas dificuldades de classificação podem complicar a análise de um sistema de ação rápida como o SRA. Assim, tentar analisar esses fetos isoladamente deixam as questões sem respostas.

A Ang II participa da vasoconstrição observada tanto nos vasos umbilicais como nos vilos placentários, agravando as trocas de nutrientes e oxigênio entre mãe e filho. De acordo com os resultados deste estudo, que avaliou fetos com CIUR e AIGs, verificou-se que a expressão de Ang II tendeu a ser maior na placenta dos fetos com CIUR abaixo de 35 semanas, apesar de não se terem apurado diferenças estatísticas. A expressão de Ang-(1-7)

foi maior na placenta de fetos AIGs, mas sem diferença estatística, devido ao baixo número de casos. A ECA2, que converte Ang II e Ang-(1-7), apresentou maior expressão na placenta em fetos AIGs. A ECA estabelece uma barreira, demonstrando que o alcance da idade gestacional, saindo da prematuridade extrema, ocorre devido à sua maior expressão. Parece que o balanço fetoplacentário do SRA orienta-se para fatores vasoconstritores em fetos com CIUR, mas não se pode afastar a contribuição da prematuridade. Além disso, a pouca expressão do receptor *Mas* na placenta em fetos com CIUR pode reforçar o desvio dessa cascata em direção à Ang II.

No cordão umbilical, a expressão de Ang II e Ang-(1-7) reportou-se aumentada nos fetos com CIUR, mas não houve diferença estatística. Da mesma forma, os níveis plasmáticos de Ang II e Ang-(1-7) também não demonstraram diferença estatística, apesar de que a média dos valores de Ang II encontram-se cerca de 40 vezes maiores do que de Ang-(1-7).

Quando se avaliou o nível de Ang II materno em relação aos grupos de fetos com CIUR e fetos AIGs, não foram identificadas diferenças estatísticas. Mas, quando avaliado o nível de Ang-(1-7) no plasma materno em relação a esses mesmos grupos, os níveis de Ang-(1-7) encontraram-se estatisticamente mais elevados no grupo de fetos com CIUR em relação aos fetos normais abaixo de 35 semanas. Outro achado é que a média do nível de Ang II no plasma materno foi cerca de 20 vezes mais elevado do que os níveis de Ang-(1-7).

Novamente se observou que também no plasma o SRA está direcionado para a vasoconstrição. Entretanto, frente à restrição de crescimento, ocorreu elevação dos fatores vasodilatadores em uma fase em que o feto poderia crescer, abaixo de 35 semanas de gestação. Conforta o fato de que a regulação do SRA fetal depende da regulação do sistema materno e que essa regulação pode permitir que o feto volte a crescer e atingir idade gestacional mais tardia, saindo dos riscos da prematuridade. Ou seja, mesmo prematuro, o feto pode responder ao insulto com suporte materno, com elevação do nível de um vasodilatador, a Ang-(1-7). NÃO TEMOS COMO COMPARAR ESTE RESULTADO COM OUTROS ESTUDOS?

Isso reforça a tendência deste estudo a procurar entender o tipo e a gravidade desse insulto e não apenas seu resultado, que no caso seria o déficit de crescimento do feto.

Não se sabe se o acometimento crônico ou agudo poderia fazer com que o SRA se comportasse da mesma forma. A maior parte dos nossos casos são fetos de mães com pré-eclampsia, que seria um insulto agudo para o crescimento em relação aos fetos de mães previamente hipertensas.

Muitas outras questões ainda precisam ser interpretadas. Uma delas é que não existe diferença em relação ao óxido nítrico entre fetos com CIUR e fetos com crescimento adequado, como verificado em nossa dissertação de mestrado. Ou melhor, o efeito vasodilatador da Ang-(1-7) mediado indiretamente pelo óxido nítrico parece estar prejudicado nesses fetos ou acontecer somente em fase posterior.

Apesar de todo o esforço, a literatura tem mostrado resultados bastante divergentes. Herse *et al.* (2007) não enfatizaram diferenças significativas nos níveis de mRNA de angiotensinogênio na placenta de gestações normais comparadas com gestações com pré-eclampsia. Ito *et al.* (2002) descreveram que não existe diferença significativa nos níveis de ECA2 - proteína e mRNA na placenta de pacientes normais e com pré-eclampsia. Li *et al.* (2000) não salientaram diferença significativa na expressão de renina nos tecidos vilos coriônicos entre gestações normais e com pré-elampsia. Zappellini *et al.* (1996) não referiram diferenças significativas nos níveis de Ang II na placenta de pacientes normais e com pré-eclampsia. Anton *et al.* (2008) afirmaram que o SRA do sistema vilos coriônico é desregulado em mulheres com pré-eclampsia, com aumento significativo de Ang II associado à *up regulation* do mRNA dos receptores de angiotensinogênio e AT<sub>1</sub>. Com o aumento na Ang-(1-7) e a diminuição modesta do receptor *Mas*, o balanço de dois peptídeos ativos do SRA foi em direção à Ang II. Os resultados desse estudo demonstraram a melhor ação de Ang II, incluindo vasoconstrição, que predominará e poderá contribuir para a fisiopatologia da pré-eclampsia.

Outra questão importante é que não há dados para comparar efetivamente o presente trabalho. As pesquisas não apresentam grupos de restrição de crescimento. Os grupos de comparação são baseados em gestações muito iniciais ou tardias. Futuramente, deve-se empenhar em grupos maiores e mais estratificados em doenças agudas e crônicas, pois, embora inibidores da ECA, são contraindicados durante a gravidez. Estratégias clínicas para regular o SRA nesses casos podem ser benéficas. Uma delas pode ser aumentar a

disponibilidade de Ang-(1-7) na placenta e cordão umbilical, permitindo o crescimento potencial desses fetos ainda dentro do útero materno.

PROPOSIÇÕES. PARA ONDE VAMOS? ONDE A PESQUISADORA DR. JULIANA PRETENDE IR. PROPONHA NOVOS ESTUDOS E LINHAS DE PESQUISA COM ESTE TEMA E OUTROS QUE SÃO RELACIONADOS.

## **7. 2 IMPLICAÇÕES CLÍNICAS**

- A angiotensina II pode estar relacionada com a vasoconstrição dos vilos placentário e do cordão umbilical.
- O nível mais elevado de angiotensina-(1-7) materna abaixo de 35 semanas de gestação em fetos com CIUR sugere a tentativa de se restabelecer o crescimento padrão.
- A elevação do nível de Ang 1-7 materno poderia indicar a possibilidade de intervenção da gestação de fetos com CIUR.

## **7 CONCLUSÕES**

**Após a análise dos nossos resultados pudemos concluir**

**que:**

O Sistema Renina Angiotensina participa da fisiopatologia da Restrição do crescimento intra-útero

A concentração de Ang 1-7 é maior em fetos com CIUR abaixo de 35 semanas em relação aos fetos adequados para a idade gestacional no mesmo intervalo.

A expressão de Ang II tendeu a ser maior na placenta dos fetos com CIUR abaixo de 35 semanas.

A expressão de Ang-(1-7) foi maior na placenta de fetos AIGs.

A ECA2, que converte Ang II e Ang-(1-7), apresentou maior expressão na placenta em fetos AIGs.

O receptor Mas na placenta em fetos com CIUR tem uma expressão fraca

No cordão umbilical, a expressão de Ang II e Ang-(1-7) reportou-se aumentada nos fetos com CIUR.

## REFERÊNCIAS

AKISU, M. *et al.* The role of angiotensin-converting enzyme and apolipoprotein-E gene polymorphisms on lipid compositions in newborn infants with intrauterine growth restriction. **Early Human Development**, v. 78, p. 95-103, 2004.

ANTON, L.; BROSNIHAN, K.B. Systemic and uteroplacental renin--angiotensin system in normal and pre-eclamptic pregnancies. **The Adv Cardiovasc Dis**, v. 2, n. 5: p. 349-62, Oct. 2008.

ANTON, L. *et al.* Activation of local chorionic villi angiotensin II levels but no angiotensin (1-7) in preeclampsia. **Hypertension**, v. 51, p. 1066-1072, 2008.

BAI, D. *et al.* The design and preliminary evaluation of a home electrocardiography and blood pressure monitoring network. **J Telemed Telecare**, v. 2, n. 2, p. 100-6, 1996.

BARKER, D.J. *et al.* Growth and chronic disease: findings in the Helsinki Birth Cohort. **Ann Hum Biol**, v. 36, n. 5: p. 445-58, Sep-Oct. 2009.

CABRAL, A.C.V.; AGUIAR, R.A.L.P.; PEREIRA, A.K. Diagnóstico antenatal da diástole zero na artéria umbilical e a ocorrência da enterocolite necrotizante neonatal. Belo Horizonte: **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 3, n. 3, p. 6-7, jul./set. 1993.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. *et al.* Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. Department of Brain and Vascular Research, Cleveland Clinic Foundation, Ohio 44195. **Am J Physiol**, v. 257, n.1 Pt 2: p. H324-9, Jul. 1989.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. *et al.* Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. **Am J Physiol**, V. 263, n. 1 Pt 2: p. R89-94, Jul. 1992.

COSTA, A.P. *et al.* Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. **Endocrinology**, v. 144, n. 5: p. 1942-8, May. 2003.

CREASY, R.; RESNIK, R. Maternal-Fetal medicine principles and practice. **Editora** Nov. 2008.

DZAU, V.J. Molecular and physiological aspects of tissue renin-angiotensin system: emphasis on cardiovascular control. **J Hypertens Suppl**, v. 6, n. 3: p. S7-12, Dec. 1988.

FERRARIO, C.M. *et al.* Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 30, n. 3 Pt 2: p. 535-41, Sep. 1997.

FONTES, M.A. *et al.* Angiotensin peptides acting at rostral ventrolateral medulla contribute to hypertension of TGR(mREN2)<sup>27</sup> rats. **Physiol Genomics**, v. 2, n. 3: p. 137-42, Apr. 2000.

HECHER, K. *et al.* Fetal venous, intracardiac, and arterial blood flow measurements in intrauterine growth retardation: relationship with fetal blood gases. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 173, n. 1, p. 10-15, Jul. 1995.

HERSE, F. *et al.* Dysregulation of the circulating and tissue-based renin-angiotensin system in preeclampsia. **Hypertension**, v. 49, p. 604-611, 2007.

ITAKURA, A.; MIZUTANI, S. Involvement of placental peptidases associated with renin-angiotensin systems in preeclampsia. **Bioch Bioph Acta**, v. 1751, p. 68-72, 2005.

ITO, M. *et al.* Possible activation of the renin-angiotensin system in the feto-placental unit in preeclampsia. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 4: p. 1871-8, Apr. 2002.

IYER, S.N. *et al.* Contribution of angiotensin-(1-7) to blood pressure regulation in salt-depleted hypertensive rats. **Hypertension**, v. 36, n. 3: p. 417-22, Sep. 2000.

KAKAR, S.S. *et al.* Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. **Bioch Bioph Res Commun**, v. 31, n. 183(3): p. 1090-6, Mar. 1992.

KIM, S. *et al.* Adrenal and circulating renin-angiotensin system in stroke-prone hypertensive rats. **Hypertension**, v. 20, n. 3: p. 280-91, Sep. 1992.

KNOCK, G.A. *et al.* Angiotensin II (AT1) vascular binding sites in human placenta from normal-term, preeclamptic and growth retarded pregnancies. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 271, n. 2: p. 1007-15, Nov 1994.

LAHTI, J. *et al.* Prenatal growth, postnatal growth and trait anxiety in late adulthood - the Helsinki Birth Cohort Study. **Acta Psychiatr Scand**, PMID: 19570107, Jun. 2009.

LEITE, H.V. **Estudo da adaptação fetal ao sofrimento crônico**: avaliação dopplerfluxométrica, hematimétrica e metabólica (Tese de doutorado em Ginecologia e Obstetrícia). Belo Horizonte Universidade Federal de Minas, 1998, 89 p.

LI, C. *et al.* Definitive molecular evidence of renin-angiotensin system in human uterine decidual cells. **Hypertension**, v. 36, n. 2: p. 159-64, Aug. 2000.

MARI, G.; HANIF, F. Intrauterine growth restriction: How to manage and when to deliver. **Clin Obstet Gynecol**, v. 50, n. 2, p. 497-509, 2007.

MELO, V.H. **Doppler das artérias umbilical e cerebral média no estudo da “centralização” de fluxo sanguíneo fetal e no diagnóstico do crescimento intrauterino retardado**. 1992. 187 f. (Tese de Doutorado em Clínica Obstétrica). Maternidade Escola, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1992, 187 p.

NICOLAIDES, K.H.; ECONOMIDES, D.L.; SOOTHILL, P.W. Blood gases pH and lactate in appropriate and small-for-gestational-age fetuses. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 161, n. 4, p. 996-1001, Apr. 1989.

PEETERS, L.L.H. *et al.* Blood flow to fetal organs as a function of arterial oxygen content. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 135, n. 5, p. 637-646, Nov. 1979.

PUCELL, A.G. *et al.* Biochemical properties of the ovarian granulosa cell type 2-angiotensin II receptor. **Endocrinology**, v. 128, n. 4: p. 1947-59, Apr. 1991.

REUSS, M.L. *et al.* Hemodynamic effects of adrenergic blockade during hypoxia fetal in sheep. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 142, p. 410-415, 1982.

ROSS, M.G.; BEALL, M.H. Adult sequelae of intrauterine growth restriction. **Sem Perinatol**, v. 32, p. 213-218, 2008.

SCHERJON, A.S. *et al.* The “brain-sparing” effect: antenatal cerebral doppler findings in relation to neurologic outcome in very preterm infants. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 169, n. 1, p. 169-175, Jul. 1993.

SCHIAVONE, M.T. *et al.* Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. **Proc Natl Acad Sci US**, v. 85, n. 11: p. 4095-8, Jun. 1988.

SEN, S.; SMEBY, R.P.; BUMPUS, F.M. Angiotensin antagonist and possible release of catecholamine. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 147, n. 3: p. 847-9, Dec. 1974.

SENANAYAKE, P.S. *et al.* Adrenal, kidney, and heart angiotensins in female murine Ren-2 transfected hypertensive rats. **Peptides**, v. 19, n. 10: p. 1685-94, 1998.

SILVA, L.C. *et al.* Cardiovascular effects produced by micro-injection of angiotensin-(1-7) on vasopressor and vasodepressor sites of the ventrolateral medulla. **Brain Res**, v. 11, n. 613(2): p. 321-5, Jun. 1993.

THAPA, L.; HE, C.M.; CHEN, H.P. Study on the expression of angiotensin II (ANG II) receptor subtype 1 (AT1R) in the placenta of pregnancy-induced hypertension. **Placenta**, v. 25, p. 637-641, 2004.

THORP, J.M.; CEFALO, R.C. Maternal fetal physiological interactions. *In*: CLARK, S.L. *et al.* **The critical ill pregnant patient**. 2. ed. Boston: Blackmell Scientific Publications, 1990. p. 102-111.

- TRINDER, D. *et al.* Regulation of vasopressin receptors in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. **Hypertension**, v. 20, n. 4: p. 569-74, Oct. 1992.
- VALDES, G. *et al.* Distribution of angiotensin-(1-7) and ACE2 in human placentas of normal and pathological pregnancies. **Placenta**, v. 27, p. 200-207, 2006.
- VAZ-SILVA, J. *et al.*. **The vasoactive peptide angiotensin-(1-7), its receptor Mas and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human endometrium.** Department of Obstetrics and Gynecology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, 2008
- WALDMAN, H.M. *et al.* Responsiveness of plasma atrial natriuretic factor to short-term changes in left atrial hemodynamics after percutaneous balloon mitral valvuloplasty. **J Am Coll Cardiol**, v. 12, n. 3: p. 649-55, Sep. 1988.
- WELCHES, W.R. *et al.* Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. **J Hypertens**, v. 9, n. 7: p. 631-8, Jul. 1991.
- WHITEBREAD, S. *et al.* Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. **Bioch Bioph Res Commun**, v. 30, n. 163(1): p. 284-91, Aug. 1989.
- ZAPPELLINI, A. *et al.* In vivo inhibition of nitric oxide synthesis does not depend on renin-angiotensin system activation. **Eur J Pharmacol**, v. 19, n. 317(2-3): p. 285-91, Dec. 1996.
- ZISMAN, L.S. *et al.* Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles: evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme Homologue ACE2. **Circulation**, v. 7; n. 108(14): p. 1707-12, Oct. 2003.

## APÊNDICE E ANEXO

### ANEXO 1 – Consentimento pós-informado empregado no estudo

#### CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

- 1) A Pré-eclampsia e a Restrição de Crescimento são doenças graves da gestação em que a pressão arterial se encontra alta, colocando em risco a mãe e seu filho.  
Até o momento não se conhece exatamente como prevenir ou mesmo tratar adequadamente essa doença.
  
- 2) Diversos estudos vêm sendo feitos na tentativa de se entender por que a pré-eclâmpsia acontece apenas em algumas mulheres gestantes (cerca de 8%).  
  
Para isto, substâncias estão sendo investigadas no sangue da mulher grávida com pressão alta e na gestante normal e de seus filhos, bem como no cordão e na placenta.
  
- 3) Eu, ..... portadora de documento de identidade n.º ..... expedido pela ....., estou ciente do que foi exposto acima e autorizo a retirada de amostra de meu sangue, placenta e sangue do cordão umbilical, após o nascimento de meu filho, para esta pesquisa.

Participo de forma voluntária deste estudo e estou ainda ciente de que as amostras colhidas não trarão qualquer prejuízo à minha saúde ou a de meu bebê.

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

Assinatura da Paciente

Telefone para contato: 031 3248 9422 (Maternidade Hospital das Clínicas da UFMG).

## **PARECER ÉTICO**

O projeto desta pesquisa foi aprovado pela Câmara Departamental de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFMG.

O protocolo da pesquisa, sob o número \_\_\_\_\_, foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG) em

