

CAROLINA ANTUNES MAGALHÃES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AMIDÁSICA DA
CALICREÍNA TECIDUAL HUMANA NA URINA DE
PACIENTES COM DIABETES MELLITUS
GESTACIONAL E DE MULHERES SADIAS
GESTANTES E NÃO GESTANTES**

**FACULDADE DE FARMÁCIA DA UFMG
BELO HORIZONTE**

2009

CAROLINA ANTUNES MAGALHÃES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AMIDÁSICA DA
CALICREÍNA TECIDUAL HUMANA NA URINA DE
PACIENTES COM DIABETES MELLITUS
GESTACIONAL E DE MULHERES SADIAS
GESTANTES E NÃO GESTANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho

Co-Orientador: Prof. Dr. Amintas Fabiano de Souza Figueiredo

**FACULDADE DE FARMÁCIA DA UFMG
BELO HORIZONTE**

2009

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Amintas Fabiano de Souza Figueiredo e à Professora Dra. Maria das Graças Carvalho, pelo apoio, pela partilha do saber, por me acompanharem nesta jornada e por estimularem o meu interesse pelo conhecimento e pela vida acadêmica.

Aos médicos, Dr. Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior, Dr. Ricardo Barsaglini da Silva Leite, Dr. Paulo Augusto Carvalho Miranda e Dra. Anelise Impelizeri Nogueira, que de forma muito gentil me ajudaram na busca pelas pacientes desta pesquisa.

Aos professores, Dra. Ângela Maria Quintão Lana, Dr. Miguel Houri Neto, Ms. Natascha Almeida e também à Danilo Gonçalves Bastos, pelo enorme interesse e disposição que tiveram em colaborar com a análise estatística deste estudo.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, aos professores e funcionários da Faculdade de Farmácia da UFMG, aos colegas do curso e aos participantes da pesquisa.

À toda a minha família, ao meu pai, Paulo César, à minha mãe, Fátima e aos meus irmãos, Leonardo e Felipe, pelo amor, alegria e atenção sem reservas.

RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é um grupo de desordens do metabolismo dos carboidratos no qual a glicose é subutilizada, produzindo hiperglicemia. O DM gestacional (DMG), é uma intolerância a carboidrato de severidade variável com o aparecimento ou primeiro reconhecimento durante a gravidez. Ela pode persistir ou desaparecer após o parto. O papel da calicreína tecidual humana (hK1) urinária no DM ainda não está esclarecido. Estudos prévios relatam o envolvimento da hK1 urinária na patogênese do DM tipo 1. O presente estudo tem como objetivo avaliar o comportamento da hK1 urinária em pacientes com DMG. Trinta pacientes com DMG foram selecionadas. Trinta gestantes saudáveis e trinta não gestantes saudáveis foram usadas como controles. Uma amostra aleatória de urina foi utilizada. Proteína foi determinada com o Azul Brilhante de Coomassie G-250. Creatinina foi determinada pelo método de Jaffé. A atividade amidásica da hK1 foi estimada com o substrato D-Val-Leu Arg-Nan e expressa em $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de creatinina para corrigir as diferenças na concentração da urina. A atividade amidásica específica da hK1 foi significativamente maior na urina das gestantes com DMG do que na urina das gestantes saudáveis e das não gestantes saudáveis. Por outro lado, não foi observada diferença significativa da atividade amidásica específica da hK1 entre as gestantes saudáveis e as não-gestantes saudáveis. A excreção da creatinina não foi significativamente diferente entre as pacientes com DMG e os outros grupos de mulheres. Por outro lado, a excreção da creatinina foi significativamente mais alta nas não-gestantes saudáveis do que nas gestantes saudáveis. O PCR foi mais alto nas pacientes com DMG do que nos outros grupos de mulheres. Acredita-se que a hiperglicemia seja responsável pelo aumento da atividade amidásica específica da hK1 nas gestantes com DMG.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic disorders on carbohydrate metabolism in which glucose, being underutilized, produces hyperglycemia. Gestational diabetes mellitus (GDM) is a carbohydrate intolerance of variability severity with onset or first recognition during pregnancy. It can persist or disappear after the childbirth. The role of urinary human tissue kallikrein (hK1) in DM is not clear yet. Previous studies describe the involvement of urinary hK1 in the type 1 DM pathogenesis. The aim of the present study was to evaluate the role of urinary hK1 in GDM patients. Thirty GDM patients were selected. Thirty healthy pregnant and thirty healthy non-pregnant women, were used as controls. A random sample urine collection was used. Protein was determined with Coomassie Brilliant Blue G-250. Creatinine was determined by Jaffe's method. hK1 amidase activity was estimated with D-Val-Leu-Arg-Nan substrate and expressed in $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ creatinine to correct for differences in urine flow. Protein/creatinine ratio (PCR) was calculated. hK1 amidase activity was significantly higher in the urine of GDM patients than in healthy pregnant and in healthy non-pregnant women. On the other hand, hK1 amidase activity was not statistically different between healthy pregnant and healthy non-pregnant women. Creatinine excretion was not statistically different between GDM patients and the other groups of women. On the other hand, creatinine excretion was statistically higher in the healthy non-pregnant than in healthy pregnant women. PCR was higher in DMG patients than in the other groups of women. It's given credit that the hyperglycemic status cause the increase of hK1 amidase activity in GDM patients.

LISTA DE FIGURAS

1	Liberación de cininas provenientes dos sistemas calicreína plasmática e calicreína tecidual	28
2	Principais peptídeos vasoativos liberados dos cininogênios por cininogenases	32
3	Interação da enzima hK1 com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan	42
4	Distribuição dos valores de creatinina urinária entre os grupos	59
5	Distribuição dos valores dos índices proteína/creatinina urinários entre os grupos	60
6	Distribuição dos valores de atividade amidásica específica da hK1 urinária entre os grupos	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADA	American Diabetes Association
AGES	Produtos finais de glicação avançada
ATP	Adenosina trifosfato
BK	Bradicinina
CT	Caliceína tecidual
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CP	Caliceína plasmática
DM	Diabetes Mellitus
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
DMID	Diabetes Mellitus Insulino-Dependente
DMNID	Diabetes Mellitus Não Insulino-Dependente
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ESAD	Associação Européia de Diabetes
hK1	Caliceína tecidual humana
HMWK	Cininogênio de alto peso molecular
IDF	Fundo Interno de Diabetes
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
LDL	Lipoproteína de densidade baixa
LMWK	Cininogênio de baixo peso molecular
Lys-Bk	Lisil-bradicinina ou calidina
Met-Lys-BK	Metionil-lisil-bradicinina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Protein-creatinine ration
PSA	Antígeno prostático específico
RFG	Ritmo de filtração glomerular
RNA	Ácido ribonucléico
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SCC	Sistema caliceína-cinina
Tyr	Tirosina
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 DIABETES MELLITUS	12
1.1.1 Classificação do Diabetes Mellitus	12
1.2 DIABETES MELLITUS GESTACIONAL	13
1.2.1 Complicações e fatores de risco do Diabetes Mellitus Gestacional	15
1.2.2 Diagnóstico do Diabetes Mellitus Gestacional	16
1.2.3 Tratamento do Diabetes Mellitus Gestacional	19
1.3 EFEITOS DA HIPERGLICEMIA	21
1.4 EFEITOS DA INSULINA	23
1.5 SISTEMA CALICREÍNA-CININA	25
1.5.1 Calicreínas	25
1.5.2 Cininogênios e cininas	31
1.5.3 Sistema calicreína-cinina plasmático	34
1.5.4 Calicreínas teciduais	36
1.5.5 Atividade enzimática das calicreínas teciduais	40
2 OBJETIVOS	43
2.1 Objetivo geral	44
2.2 Objetivos específicos	44

	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 CASUÍSTICA	46
3.1.1 Critérios de inclusão e de exclusão	47
3.2 Coleta e processamento da amostra	48
3.3 Materiais e Equipamentos	49
3.4 Métodos	50
3.4.1 Determinação da atividade amidásica da calicreína tecidual humana (hK1)	50
3.4.2 Determinação de proteínas	51
3.4.3 Determinação de creatinina	53
3.4.4 Análise química da urina	54
3.4.5 Atividade amidásica específica da hK1	54
3.4.6 Índice proteína/creatinina	55
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
4 RESULTADOS	56
4.1 Excreção urinária de proteína e creatinina, índice proteína/creatinina e valores de atividade amidásica específica da hK1	57
5 DISCUSSÃO	62
5.1 Excreção urinária de proteína, creatinina e índice proteína/creatinina	63
5.2 Valores de atividade amidásica específica da hK1 no grupo DMG e nos grupos controles 1 e 2	66
5.3 Perspectivas	68
6 CONCLUSÕES	70
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus (DM) é um grupo de desordens metabólicas do metabolismo dos carboidratos no qual a glicose é subutilizada, produzindo hiperglicemia. Alguns pacientes podem experimentar episódios hiperglicêmicos agudos ameaçadores à vida tais como cetoacidose ou coma hiperosmolar. À medida em que a doença progride os pacientes estão em risco crescente para o desenvolvimento de complicações específicas incluindo a retinopatia levando à cegueira, a nefropatia levando à insuficiência renal, a neuropatia e a aterosclerose. Esta, pode resultar em derrame cerebral, gangrena e doença arterial coronariana.

A prevalência do DM é desconhecida. No Brasil, entre 1986 e 1989, com o apoio da sociedade Brasileira de Diabetes, o Ministério da Saúde e o Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) realizaram um censo nacional sobre a prevalência do DM. Este estudo mostrou uma prevalência de 7,6% na população entre 30 e 69 anos. Um dado importante foi de que 50% das pessoas não conheciam o diagnóstico.

1.1.1 Classificação do Diabetes Mellitus

Em 1997, a Organização Mundial de Saúde (WHO) e a Associação Americana de Diabetes (ADA) acordaram numa nova classificação para o DM. As duas categorias principais de DM são:

- DM tipo 1: descrito anteriormente como diabetes mellitus insulino-dependente (DMID), caracterizado por destruição das células beta pancreáticas, geralmente ocasionando deficiência absoluta de insulina, de natureza auto-imune ou idiopática. Essa forma ocorre mais freqüentemente em crianças e adolescentes.

Aproximadamente 5 a 10% de todos os casos de DM estão nesta categoria. Os pacientes comumente têm o aparecimento brusco dos sintomas: poliúria (aumento do volume e da frequência urinários), polidipsia (sensação de sede aumentada levando ao aumento da ingestão de água) e perda rápida de peso.

- DM tipo 2: anteriormente denominado de diabetes mellitus não insulino-dependente (DMNID), decorrente de uma predominância de resistência à insulina com relativa deficiência de sua síntese, ou de um defeito predominantemente secretório, com ou sem resistência à insulina. Ocorre mais freqüentemente em adultos, mas a incidência entre os adolescentes é crescente, a cada dia. Esse tipo de diabetes é a forma mais comum e corresponde a cerca de 90% dos casos de DM no mundo (WHO, 2002). Os pacientes têm mínimos sintomas, não são propensos à cetose e não são dependentes de insulina para prevenir a cetonúria. A obesidade é comumente associada a este tipo de diabetes.

1.2 DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

Outro tipo de diabetes é o diabetes mellitus gestacional (DMG), uma doença manifestada pela alteração das taxas de glicose no sangue durante a gravidez. Esta alteração pode persistir ou desaparecer após do parto.

Segundo a Associação Americana de Diabetes (ADA, 2008), o DMG atinge 4% de todas as mulheres grávidas, cerca de 135.000 casos nos Estados Unidos a cada ano.

As gestações normalmente estão relacionadas com um aumento da resistência à insulina, principalmente no final do segundo e no terceiro trimestre. As grávidas

mantêm a glicemia normal aumentando a secreção de insulina, porém, no DMG as pacientes não aumentam esta secreção a um nível suficiente (METZGER, 2007).

Como nos outros tipos, a causa exata do DMG é desconhecida. Contudo, os especialistas explicam que no período da gravidez, a placenta produz hormônios em grande quantidade. Embora imprescindíveis para o desenvolvimento do bebê, os hormônios criam no organismo da grávida resistência à ação da sua insulina. Todas as mulheres grávidas têm algum grau de resistência insulínica, mas as mulheres com DMG apresentam essa resistência aumentada. Esta doença costuma aparecer por volta da vigésima quarta semana de gravidez, exatamente quando a placenta começa a produzir grandes quantidades de hormônios. Por isso o rastreamento para esta doença ocorre nesse período da gestação (24^a a 28^a semanas de gestação) (ADA,2009).

1.2.1 Complicações e fatores de risco do Diabetes Mellitus Gestacional

As complicações do DMG envolvem o risco de síndrome hipertensiva e a necessidade de parto prematuro ou cesariano. Além disso os filhos de mães com DMG têm maior risco de macrosomia (bebês com peso superior a 4 quilos), e outras complicações pós-natais, como a hiperbilirrubinemia. Segundo a ADA (1999) a glicemia de jejum maior que 105 mg/dL (5,8 mmol/L) pode estar associada ao aumento do risco de óbito fetal nas últimas 4 a 8 semanas de gestação.

Os fatores de risco do DMG são semelhantes àqueles do DM tipo 2 e incluem:

- Idade acima de 25 anos;
- Obesidade ou ganho excessivo de peso na gravidez atual;
- Deposição central excessiva de gordura corporal (gordura em excesso no tronco);
- História familiar de diabetes em parentes de 1º grau;
- Baixa estatura (1,50 m);
- Crescimento fetal excessivo;
- Pré-eclâmpsia, uma síndrome caracterizada por hipertensão, edema e proteinúria;
- Antecedentes obstétricos de morte fetal ou neonatal, de macrosomia (peso excessivo do bebê) ou de DMG.

O sucesso no controle do DMG depende de que ele seja diagnosticado o mais precocemente possível, a fim de que a paciente e o feto possam se beneficiar do tratamento. Com a progressão da gravidez, a intolerância materna aos hidratos de carbono tende a aumentar e mesmo graus menores de intolerância podem afetar o desenvolvimento fetal (SBD, 2008)

1.2.2 Diagnóstico do Diabetes Mellitus Gestacional

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2009) as solicitações dos exames de glicose e curva glicêmica, bem como da sua interpretação vêm sendo objeto de grandes controvérsias e de disputas entre médicos, pacientes e laboratórios.

Parte da dificuldade pode ser explicada pelo período atual de desenvolvimento científico e tecnológico, e, sobretudo pela velocidade com a qual a informação tem mudado e se difunde nos últimos anos. Assim, convive-se com formas de solicitações e interpretações de exames dos primórdios da bioquímica, até mudanças ocorridas recentemente em 2005 (SBD, 2008).

Vale à pena lembrar que os primeiros testes de sobrecarga de glicose datam de 1958 e foram padronizados segundo os critérios do bioquímico O`Sullivan, quando ainda não eram conhecidas as diretrizes das grandes organizações mundiais da saúde, nem os consensos das atuais sociedades científicas no mundo inteiro que trabalham com as chamadas evidências clínicas e epidemiológicas.

Uma outra razão favorável a confusão diz respeito aos chamados valores normais, bem como às determinações de glicemias realizadas fora do jejum. Nos últimos anos viu-se um extraordinário desenvolvimento dos métodos epidemiológicos, programas estatísticos mais poderosos, os estudos baseados em evidências, os testes clínicos, o fortalecimento dos consensos nacionais, o surgimento da informática, as dosagens de insulina, de anticorpos, do peptídeo C etc,

Como consequência, tem-se observado mudanças nos critérios de diagnóstico com muita rapidez, tornando o ambiente muito confuso. Médicos, laboratórios e pacientes muitas vezes divulgando e interpretando resultados de formas até conflitantes. Entrou-se na moda do “diabetes leve, quase diabetes, um início de diabetes, pré-diabetes, intolerância à glicose, síndrome metabólica, resistência à insulina, etc”.

As organizações mais representativas do DM são:

- Organização Mundial de Saúde (OMS);
- Associação Americana de Diabetes (ADA);
- A Fundação Internacional de Diabetes (IDF);
- A Associação Européia de Diabetes (ESAD);
- A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD).

Para se determinar os pontos de corte, ou seja, quais os valores de glicemia devem ser considerados normais ou alterados são necessários estudos epidemiológicos acompanhando grupos de indivíduos de ambos os sexos por um longo período de tempo. Durante este tempo algumas pessoas continuam com valores normais, mas outras podem evoluir para o aparecimento de diabetes. Além disso, estes valores são correlacionados com o surgimento de doenças cardiovasculares. A partir de modelos matemáticos são determinados os pontos de corte para a interpretação das curvas.

Fica claro que a definição dos valores das glicemias tanto de jejum como no teste de tolerância à glicose passam por uma rigorosa metodologia científica e não são resultados de simples observação clínica. Para complicar, as entidades acima mencionadas têm discordância nestes pontos de corte, embora a longo prazo

caminhem para uma convergência de interpretação, de nomenclatura e das técnicas de realização dos testes. De acordo com a ADA (2009), o diagnóstico do diabetes gestacional é feito com triagem universal de todas as pacientes da seguinte maneira:

Testes (realizados entre a 24^a e 28^a semanas de gestação):

1) Glicemia após jejum de 8-14 horas

- a) Glicemia de jejum igual ou superior a 110 mg/dL (6,0 mmol/L) mas inferior a 126 mg/dL (7,0 mmol/L) - intolerância à glicose;
- b) Glicemia de jejum igual ou superior a 126 mg/dL (7,0 mmol/L) - diabetes;
- c) Valores glicêmicos ao acaso, independente do horário de refeição, iguais ou superiores a 200 mg/dL (11,1 mmol/L) - diabetes.

2) Testes orais de sobrecarga à glicose, utilizando 100 g de glicose anidra ou 75 g de glicose anidra em solução a 20% :

- a) Sobrecarga de 100 g: valores glicêmicos estipulados para interpretação do teste, aos 0, 60, 120 e 180 minutos, são 95,180,155,140 mg/dL. Dois pontos iguais ou superiores a estes valores indicam o diagnóstico de diabetes gestacional;
- b) Sobrecarga de 75 g: são necessários apenas três valores glicêmicos aos 0, 60 e 120 minutos, sendo que dois pontos iguais ou superiores a 95,180 e 155 mg/dL indicam o diagnóstico de diabetes gestacional.

1.2.3 Tratamento do Diabetes Mellitus Gestacional

O tratamento do DMG tem por objetivo minimizar as complicações dos bebês no nascimento, mas essas complicações estão menos freqüentes hoje em dia. Com relação à mãe, além do aumento do risco de cesariana, o diabetes gestacional pode estar associado à toxemia, uma condição da gravidez que provoca pressão alta e geralmente tem como acompanhante o edema das pernas podendo causar um parto premature (SBD, 2009).

O DMG é inicialmente tratado com planejamento alimentar, que idealmente deve ser orientado por nutricionista. Os exercícios físicos podem fazer parte do tratamento e serão orientados pelo seu médico. De maneira geral, mulheres que já faziam atividade física podem continuar a fazê-la normalmente. Caso essas medidas não surtam os efeitos esperados pelo médico, será indicado o tratamento com insulina. Isso ocorre porque os efeitos dos antidiabéticos orais não estão bem estabelecidos na gravidez, então eles não podem ser usados nesse momento.

Outra observação importante está relacionada aos objetivos glicêmicos. No diabetes gestacional recomenda-se um controle mais estreito das taxas de glicose. A terapia nutricional é um aliado importante e para muitas mulheres é suficiente para manter a glicemia dentro dos valores recomendados pelo médico.

A dieta terá um papel singular para o tratamento do diabetes gestacional. Provavelmente, será necessário relembrar os conhecimentos básicos de nutrição.

Por isso, a procura por um nutricionista torna-se necessária. A dieta pode ser acompanhada de exercícios leves. Mesmo pessoas com algumas carências especiais durante a gravidez podem nadar ou caminhar. Entre os objetivos da terapia nutricional pode constar, também, um limite para o ganho de peso, recomendado às mulheres obesas. Isso é imprescindível, porque é mais frequente que mulheres obesas desenvolvam diabetes durante a gestação.

O médico poderá recorrer à terapia insulínica caso haja dificuldade para atingir resultados satisfatórios somente com a dieta. É comum que a resistência à insulina atinja o auge durante o terceiro trimestre. Cerca de 15% das mulheres com DMG necessitam de insulina. O regime vai depender de qual glicemia está elevada: se a glicemia de jejum ou se a glicemia pós-prandial. Qualquer hipoglicemiante oral é contra-indicado para o tratamento do DMG, pois eles atravessam barreira placentária, entretanto a glibenclamida ultrapassa minimamente e já se tem relato de que esta medicação poderia ser utilizada (SBD, 2009).

É comum haver a necessidade do aumento das doses de insulina mais no final da gravidez (a partir do terceiro trimestre). Isso simplesmente significa que a resistência à insulina da gestante está aumentando.

Mulheres que usam insulina estão em risco de apresentar hipoglicemia. Para preveni-la, é necessário que a paciente siga seu planejamento alimentar com atenção aos horários e faça as adequações necessárias à prática de exercício em função das alimentações.

A monitorização da glicose pode ser realizada em laboratório com a retirada de sangue ou em casa, com as tiras reagentes e glicosímetro. Recomenda-se que as mulheres em uso de insulina façam o controle das taxas de glicose com maior frequência, para ajuste do tratamento., talvez quatro ou mais vezes por dia. As medidas integradas de glicose (a mais importante é a taxa da glico-hemoglobina) em geral são de pouca utilidade no DMG, pois elas estão, na maioria das vezes, normais. Lembrando que o DMG é de duração curta, então isso faz com que a glico-hemoglobina não se modifique nesse período curto.

No final da gravidez a paciente é orientada a fazer exames que avaliam o bem estar do bebê com mais frequência. A mulher que apresenta DMG precisa ser reavaliada após 2 meses do parto com um exame das taxas de glicose. □Apesar de o DMG ser considerado uma situação de gravidez de alto risco, os cuidados médicos freqüentes e os cuidados tomados pelo paciente possibilitam que a gestação corra tranquilamente e que os bebês nasçam no momento adequado e em boas condições de saúde.

EFEITOS DA HIPERGLICEMIA

Os efeitos tóxicos da hiperglicemia são decorrentes principalmente do acúmulo de produtos glicosilados, não enzimaticamente, nas membranas basais dos capilares sanguíneos, e do excesso de álcoois de glicídeos osmoticamente ativos como o sorbitol nos tecidos (DAVIS; GRANNER, 1996).

Dentre os mecanismos pelos quais a hiperglicemia pode causar lesão tecidual, o principal é a glicação, não-enzimática, seja diretamente responsável pela expansão da matriz vascular e das complicações vasculares do DM (DAVIS; GRANNER, 1996).

A glicose possui um grupo aldeídico reativo que se liga, não enzimaticamente, ao grupo amina de proteínas, formando os produtos de Amadori, que têm lenta reversão. Reações de rearranjo ocorrem e produzem um grupo químico relacionado, denominado produtos finais de glicação avançada (AGES), que se mantêm irreversivelmente ligados às proteínas. Os AGES acumulam-se nos tecidos em função do tempo e da concentração de açúcar e induzem a anormalidades permanentes nas funções dos componentes da matriz extracelular, além de estimular a liberação de citocinas, a produção de espécies reativas de oxigênio através de receptores específicos para AGES e de proteínas intracelulares modificadas (OUVIÑA *et al.*, 2001). Estes efeitos podem causar um número de eventos celulares adversos, incluindo redução de atividade enzimática, lesão nos ácidos nucleicos, “ligações cruzadas” e degradação de proteínas, bem como indução de vias citotóxicas (TAN *et al.*, 2002).

O espessamento da membrana basal capilar é uma característica muito interessante do DM. A longo prazo, observa-se o estreitamento da luz dos vasos, provocando a perfusão inadequada de regiões críticas de certos órgãos. A matriz extracelular encontra-se expandida em muitas paredes vasculares, como na membrana basal da retina e nas células mesangiais do glomérulo renal (DAVIS; GRANNER, 1996). A proliferação celular em vasos de grande calibre também contribui para o estreitamento luminal. Essas alterações patológicas contribuem para as principais complicações do diabetes, caracterizadas pela macro e microangiopatia, com destaque para a aterosclerose intercapilar, retinopatia, neuropatia, ulceração e gangrena das extremidades (DAVIS; GRANNER, 1996).

1.4 EFEITOS DA INSULINA

A secreção de insulina é um processo rigidamente regulado que visa proporcionar concentrações estáveis de glicose no sangue durante o jejum e a alimentação. A glicose constitui o principal estímulo para a secreção de insulina em seres humanos e é mais eficiente quando fornecida por via oral do que quando administrada por via intravenosa. A insulina exerce um efeito hipoglicemiante, estimulando a captação e o armazenamento da glicose no fígado e no músculo, sob a forma de glicogênio, e no tecido adiposo, como triglicerídeo. Além disso, a insulina estimula a síntese de proteína e inibe a sua degradação (DAVIS; GRANNER, 1996). A insulina regula tanto o metabolismo quanto a expressão gênica. O sinal da insulina passa do receptor da membrana plasmática para as enzimas do metabolismo sensíveis à insulina e ao núcleo, onde estimula a transcrição de genes específicos. O receptor ativo da insulina consiste de duas subunidades α idênticas projetando-se para a face externa da membrana plasmática e duas subunidades β transmembranais com as suas extremidades carboxiterminais projetando-se para dentro do citosol. As subunidades α contêm o domínio de ligação da insulina e os domínios intracelulares das subunidades β contêm a atividade da proteína quinase que transfere um grupo fosfato do ATP para o grupo hidroxila dos resíduos de Tyr em proteínas-alvo específicas (LEHNINGER *et al.*, 2002).

Além de regular a concentração sangüínea de glicose no plasma, a insulina atua também estimulando o crescimento e a diferenciação celular, o armazenamento de energia sob a forma de gordura ou lipogênese, a síntese de proteínas e do glicogênio e inibe a lipólise, glicogenólise e o catabolismo protéico (SATIEL; KAHAN, 2001).

A insulina também estimula a transcrição da lipase da lipoproteína no endotélio capilar. Essa enzima hidrolisa os triglicérides presentes nas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e nos quilomícrons, resultando na liberação de partículas de lipoproteínas de densidade intermediária (IDL). As partículas de IDL são convertidas pelo fígado em lipoproteínas de baixa densidade ricas em colesterol (LDL). Dessa forma, nos pacientes diabéticos não tratados ou tratados inadequadamente, com freqüência ocorrem hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (MARTINEZ, 2003). Além disso, a deficiência de insulina pode estar associada à produção aumentada de VLDL. Tais alterações do metabolismo lipídico favorecem as complicações macrovasculares no paciente diabético (DAVIS; GRANNER, 1996).

Com grande freqüência, as anormalidades do metabolismo das gorduras, nos pacientes diabéticos, podem levar à acidose e à aterosclerose, condições que podem acarretar graves conseqüências, inclusive a morte do paciente. Em pacientes portadores de DM de longa data a diminuição da síntese de proteínas pode levar à atrofia dos tecidos, e a outros distúrbios do funcionamento celular (GUYTON; HALL, 1997).

A insulina participa, também, do transporte ativo de muitos aminoácidos para o meio intracelular. Esta compartilha com o hormônio do crescimento a capacidade de aumentar a captação de aminoácidos pelas células. A insulina tem, também, um efeito direto sobre os ribossomos aumentando a tradução de RNA-mensageiro, formando assim novas proteínas. De algum modo, ainda inexplicado, a insulina “liga” o mecanismo ribossômico. Na ausência desta, os ribossomos simplesmente param de funcionar, quase como se o hormônio acionasse um mecanismo do tipo “liga-desliga”. Por um período mais longo de tempo, a insulina aumenta também, a taxa de transcrição de seqüências genéticas de DNA selecionadas nos núcleos das células, formando assim quantidades aumentadas de RNA e ainda mais síntese protéica (GUYTON; HALL, 1997).

1.5 SISTEMA CALICREÍNA-CININA

O sistema calicreína-cinina é constituído por: calicreínas, enzimas proteolíticas presentes em vários tecidos; cininogênios, proteínas do grupo das α_2 -globulinas, produzidos no fígado, são os substratos das calicreínas; cininas, peptídeos vasoativos e espasmogênicos resultantes da proteólise limitada dos cininogênios pelas calicreínas; e cininases, enzimas proteolíticas que inativam as cininas.

1.5.1 Calicreínas

As calicreínas são um sub-grupo das serino proteases com atividade proteolítica específica e restrita. Elas liberam peptídeos vasoativos, cininas, de seus substratos, os cininogênios, presentes no plasma, linfa e líquido intersticial de mamíferos, sendo, assim, denominadas de cininogenases. Estas enzimas têm ações acentuadas *in vivo* sobre os vasos sanguíneos e músculos lisos, que são indiretas, devido à liberação de peptídeos farmacologicamente ativos, as cininas (SCHACHTER,1980).

Serino proteases são enzimas proteolíticas com um resíduo de serina ativo no sítio catalítico. Aproximadamente 32% das proteases do genoma humano são serino proteases. Esta ampla família inclui enzimas digestivas, como a tripsina e a quimotripsina, fatores da coagulação, fatores de crescimento e as calicreínas. As serino proteases estão envolvidas em muitas funções vitais, tais como digestão, coagulação, fibrinólise, remodelamento tecidual, ativação de hormônios, fatores de crescimento e degradação da matriz protéica. Várias serino proteases são excretadas como zimógenos inativos, que necessitam de proteólise limitada para liberar a enzima ativa (YOUSEF & DIAMAMDIS, 2002).

As caliceínas se dividem em duas classes, uma derivada de fontes glandulares, caliceínas glandulares ou teciduais, e a outra derivada do plasma, caliceínas plasmáticas (WEBSTER, 1970).

As primeiras caliceínas descobertas foram as glandulares. Em 1908-09, Abelous e Bardier observaram a presença de uma substância hipotensora na urina de humanos sadios, a qual chamaram de urohipotensina. Em 1920, Pribam e Herrnheiser, e em 1925, Petroff e colaboradores notaram um efeito hipotensor na urina e no suco pancreático, respectivamente. No entanto, pode-se considerar que a descoberta da caliceína ocorreu entre 1926 e 1928, quando Frey e colaboradores encontraram na urina humana uma substância termolábil e não dialisável, que produzia uma prolongada hipotensão arterial quando injetada em cães. Estes pesquisadores consideraram esta substância como um hormônio excretado, que afetava vasos sanguíneos e a circulação, e chamaram-na de *Kreislauthormon* (WEBSTER, 1970). Entre 1930-1936 Werle e colaboradores encontraram uma substância similar no pâncreas e nomearam-na de *Kallikreas*, que significa pâncreas em grego (SCHACHTER, 1980).

A partir de 1930, Werle e colaboradores descobriram a maioria dos componentes do sistema caliceína-cinina e descreveram um inibidor básico de caliceína em extratos de pâncreas bovino. Esta substância foi uma das primeiras descritas como um inibidor natural de protease. Em menos de dez anos, os autores citados caracterizaram caliceínas no pâncreas, urina, sangue, glândulas salivares, intestino, pulmão, cérebro e nervos. Em 1937, Werle e colaboradores demonstraram que a caliceína liberava, enzimáticamente, uma substância de um precursor inativo no plasma, e que essa substância provocava contrações em preparações isoladas de músculo liso, denominando-a substância DK. Werle e Berek, em 1948, recomendaram que a substância DK fosse denominada calidina, e que seu precursor, o substrato para a caliceína, fosse denominado calidinogênio (SCHACHTER, 1980).

Em 1949, Rocha e Silva, Beraldo e Rosenfeld descreveram a liberação de um peptídeo ativo, pela tripsina e alguns venenos de cobra, a partir de um substrato presente na fração globulínica do plasma. O peptídeo foi denominado bradiginina. Em 1954, Schachter e Thain, introduziram o termo cinina, por admitirem, por comparação direta, que a calidina e a bradiginina pertenciam a um grupo de peptídeos, intimamente relacionados, que eram liberados de um substrato plasmático por calicreínas, tripsina, veneno de cobra e outras proteases. Assim, ficou evidente que o sistema tripsina ou veneno de cobra-bradiginogênio-bradiginina era muito semelhante ao sistema calicreína-calidinogênio-calidina. Em 1962, Schachter e colaboradores introduziram o termo cininogenases como um termo genérico para todas as enzimas que liberam cininas, e o termo cininogênio para o substrato dessas enzimas (SCHACHTER, 1980).

QuickTime™ and a
PDF (Acrobat) Reader
are needed to see this picture.

Figura 1 Liberação de cininas pelos sistemas caliceína plasmática e caliceína tecidual (KATORI; MAJIMA, 1996).

Essas duas classes diferem no mecanismo de ativação, identidade imunológica, propriedades físico-químicas como peso molecular e ponto isoelétrico (pI), velocidade de reação com substratos naturais e sintéticos, especificidade pelos

substratos, grau de inibição por vários inibidores e na estrutura gênica (LEVINSKY, 1979; YOUSEF & DIAMANDIS, 2001).

Anteriormente, pensava-se que a família gênica das calicreínas teciduais era composta por apenas três genes: o da calicreína tecidual, pancreática e renal, (KLK1, que codifica a hK1), o da calicreína glandular (KLK2, que codifica a hK2) e o do antígeno prostático específico (PSA) (KLK3, que codifica o PSA ou hK3). Posteriormente, a família gênica das calicreínas teciduais foi completamente caracterizada e possui 15 membros ou genes localizados no mesmo cromossoma 19q13.4. Baseando-se em novas definições, os membros das famílias das calicreínas teciduais incluem não apenas o gene para a enzima calicreína tecidual verdadeira (hK1) mas também, genes que codificam proteases homólogas, localizadas na mesma região do cromossoma. Em humanos, apenas o KLK1 expressa uma enzima que apresenta a definição funcional de calicreína (YOUSEF *et al.*, 2000; YOUSEF & DIAMANDS, 2002).

Estudos atuais têm mostrado que muitos dos genes para as calicreínas teciduais e para as proteases semelhantes às calicreínas, que estão agrupados na mesma região cromossomal, estão relacionados à malignidade endócrina, como os cânceres de mama, próstata, ovário e testículo. Assim, evidências crescentes sugerem um potencial papel das calicreínas teciduais no diagnóstico e prognóstico dessas doenças malignas. O antígeno prostático específico (PSA), codificado pelo gene KLK3, já é um marcador bem estabelecido para o câncer prostático (YOUSEF & DIAMANDS, 2002).

As calicreínas teciduais verdadeiras são glicoproteínas ácidas, com pI de aproximadamente 4,0, peso molecular variando entre 25.000 e 40.000, dependendo do método, e são altamente específicas para com seus substratos (LEVINSKY, 1979; SCHACHTER, 1980). Elas pertencem a uma família multigênica, e são expressas em diferentes tecidos (YOUSEF & DIAMANDS,

2002b). A calicreína tecidual verdadeira é encontrada em vários órgãos, tais como rins, pâncreas, glândulas salivares e sudoríparas e trato gastrointestinal. A enzima está presente nas secreções exócrinas ou produtos de excreção desses órgãos. A urina de vários mamíferos, como a de ratos e a de seres humanos, e também os rins de ratos e cães e as glândulas submandibulares de ratos têm sido utilizados como fonte para a obtenção da respectiva calicreína tecidual pura. Aproximadamente 100 µg de calicreína ativa são excretadas diariamente na urina de homens e de ratos (MAYFIELD & MARGOLIUS, 1983).

A calicreína urinária humana (hk1) é um polipeptídeo de cadeia única, constituído por 238 aminoácidos, com uma isoleucina amino-terminal e uma serina carboxi-terminal (BHOOLA *et al.*, 1992). A calicreína urinária parece ser idêntica à renal e a outras calicreínas teciduais nas características moleculares, tais como peso molecular, pl e resposta a vários inibidores naturais e sintéticos. A calicreína urinária possui reação imunológica cruzada com a calicreína renal e pancreática, mas não com a plasmática. Assim, fica claro que a calicreína urinária não se origina do plasma. Vários estudos têm demonstrado que a calicreína urinária tem origem nos túbulos renais. É provável que a calicreína urinária seja sintetizada pelos rins, mas outras calicreínas glandulares, como a pancreática e a submandibular, também podem ser excretadas na urina (LEVINSKY, 1979; SCHACHTER, 1980). Segundo Katori & Majima (1996) mais de 85% da calicreína renal, nas formas ativa e inativa, localiza-se nos túbulos distais e ducto coletor cortical renais.

As calicreínas, como outras serino proteases tais como a tripsina e a trombina, são inibidas por muitos inibidores de proteases de origem animal e vegetal. Inibidores polivalentes de calicreína e tripsina são extraídos dos mastócitos de pulmão bovino, fígado, pâncreas e glândulas parótidas. A atividade da calicreína é modulada por esses inibidores presentes em muitos órgãos. A aprotinina é um exemplo de inibidor obtido de pulmão bovino (LEVINSKY, 1979; SCHACHTER, 1980).

1.5.2 Cininogênios e cininas

Os cininogênios, substratos das calicreínas, são glicoproteínas de cadeia única, sintetizadas no fígado. Nos mamíferos, três tipos de cininogênios já foram descritos, diferindo no peso molecular, na estrutura e na função biológica. O maior é comumente denominado cininogênio de alto peso molecular (HMWK), com peso molecular variando de 88.000 a 114.000, dependendo da espécie de origem. O menor, comumente denominado cininogênio de baixo peso molecular (LMWK), com peso molecular variando de 50.000 a 68.000, também conforme a espécie de origem. O terceiro tipo, denominado T-cininogênio, com peso molecular de 68.000, parece ser único do rato (MULLER-ESTERL *et al.*, 1986).

A função do HMWK, na fase de ativação por contato da via intrínseca da coagulação sanguínea, está firmemente estabelecida. Em contraste, os papéis fisiológicos do LMWK são ainda uma matéria de controvérsia. Há publicações estabelecendo uma função específica do LMWK nos processos inflamatórios via liberação da calidina (lisil-bradicinina – Lys-BK) vasoativa. Além disso, este parece estar envolvido na regulação da pressão sanguínea e na captação celular de glicose (MULLER-ESTERL *et al.*, 1985).

A proteólise limitada do HMWK pela calicreína plasmática resulta em uma rápida liberação de bradicinina. As calicreínas teciduais atuam sobre os dois tipos de cininogênios, mas agem preferencialmente sobre o LMWK (LEVINSKY, 1979). A proteólise limitada do LMWK pela calicreína tecidual libera o decapeptídeo calidina (MULLER-ESTERL *et al.*, 1986). A proteólise limitada do T-cininogênio pela tripsina libera o undecapeptídeo T-cinina (Isoleucil-seril-bradicinina – Ile-Ser-BK), (GREENBAUM & OKAMOTO, 1988).

calicreína, nas células dos túbulos distais e ductos coletores renais, facilita a ação da calicreína sobre o cininogênio, e, assim, a produção de cininas. Por outro lado, o HMWK não foi encontrado no rim ou na urina (KATORI & MAJIMA, 1996).

Quatro tipos de cininas já foram identificadas e descritas: a bradicinina (BK), a calidina (Lys-BK), a T-cinina (Ile-ser-BK) e a metionil-lisil-bradicinina (Met-Lys-BK) (MULLER-ESTERL *et al.*, 1986). As cininas exercem muitos efeitos biológicos, dos quais os mais importantes *in vivo* são: hipotensão, dor, edema local e inflamação. Em tecidos isolados, estas provocam relaxamento de vasos arteriais, contração de algumas artérias, do endotélio capilar, de veias, do útero, brônquios, intestinos, bexiga urinária e relaxamento do duodeno. Em células isoladas ou órgãos secretórios, as cininas estimulam a liberação de prostaglandinas, histamina, 5-hidroxitriptamina, catecolaminas e renina, e a proliferação celular (REGOLI & BARABÉ, 1988). As cininas são vasodilatadores potentes, promovem diurese e natriurese, protegem contra lesão isquêmica, através da diminuição da aderência endotelial de leucócitos, reduz o rompimento da barreira microvascular e reduz a lesão tecidual (CAMPBELL, 2003).

A bradicinina, descoberta pelos pesquisadores brasileiros, Rocha e Silva, Beraldo e Rosenfeld em 1949, é um nonapeptídeo fortemente básico, com pI maior do que 10, devido à presença de resíduos de aminoácidos neutros no seu interior e de resíduos de arginina nas suas extremidades. As cininas são rapidamente inativadas por peptidases. No plasma, as principais enzimas de inativação são a cininase I, que catalisa a hidrólise da ligação peptídica Phe⁸- Arg⁹, liberando a arginina C-terminal e a cininase II que catalisa a hidrólise da ligação peptídica Pro⁷-Phe⁸ liberando o dipeptídeo Phe-Arg C-terminal (BHOOLA *et al.* 1992). Assim, devido a esta rápida inativação, os efeitos das cininas nos fluídos biológicos são muito rápidos. No sangue, a meia vida da bradicinina e da calidina é de aproximadamente 30 segundos. A calidina pode ser convertida em bradicinina pela remoção da lisina aminoterminal por aminopeptidases (BHOOLA *et al.*, 1992).

A ampla variedade de funções vasculares das cininas é exercida pela combinação destas com os receptores B1 e B2 da bradicinina (SCHERMMER-DANNINGER *et al.*, 1998). O receptor B2 normalmente predomina, ao passo que o receptor B1 é induzido por lesão tecidual (CAMPBELL, 2003). A bradicinina é um potente vasodilatador, que atua através da estimulação de receptores B2 endoteliais específicos, causando, assim, a liberação de prostaciclina, óxido nítrico e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (HORNIG & DREXLER, 1997).

Beierwaltes *et al.* (1985), em um experimento utilizando um antagonista análogo da bradicinina para estudar o possível papel da cinina endógena no controle da função renal, observaram que em uma pressão de perfusão renal normal, a administração do antagonista resultou em uma leve vasoconstrição renal, sem afetar o ritmo de filtração glomerular (RFG) e a pressão sistêmica. Este efeito pode ser devido à supressão da influência vasodilatadora da cinina ou ao aumento da taxa de secreção de renina durante a administração do antagonista.

1.5.3 Sistema calicreína-cinina plasmático

O sistema calicreína-cinina no plasma é melhor caracterizado em relação ao sistema calicreína-cinina tecidual. A calicreína plasmática ou fator de Fletcher é codificada por um único gene (KLKB1), que está localizado no cromossoma humano 4q35, e é expresso exclusivamente por células do fígado (YOUSEF & DIMANDS, 2001). A calicreína plasmática é encontrada na forma inativa, de pré-calicreína, uma proteína básica com peso molecular de 107.000 e pl de 8,5-8,9. A calicreína plasmática, está envolvida no mecanismo da coagulação. O fator XII (fator de Hageman), a pré-calicreína e o HMWK circulam no plasma complexados. A ativação inicial do fator XII pode ocorrer com a sua exposição a superfícies eletronegativas, resultando em fator XII ativado. Este por sua vez, ativa a pré-calicreína plasmática em calicreína, a qual ativa uma maior quantidade de fator XII,

retroalimentando este ciclo. O fator XII, ao ser ativado, inicia as reações da cascata da coagulação e fibrinólise no sangue. Assim, a calicreína plasmática participa da via intrínseca da coagulação, sendo que uma deficiência de pré-calicreína plasmática resulta em um tempo de coagulação elevado (LEVINSKY, 1979; SCHACHTER, 1980).

A calicreína plasmática também possui outras funções biológicas como a quimiotaxia de neutrófilos e liberação de bradicinina do HMWK plasmático. O plasma contém três inibidores que podem modular a atividade da calicreína plasmática, a saber: α_2 -macroglobulina, o inibidor do primeiro componente ativado do complemento (C1 INH) e o complexo antitrombina III-heparina (LEVINSKY, 1979; SCHACHTER, 1980).

Jaffa *et al.* (2003) mostraram que a elevação da pré-calicreína plasmática está associada positivamente com o desenvolvimento de hipertensão e macroalbuminúria em pacientes diabéticos insulino-dependentes. O aumento nos níveis de pré-calicreína plasmática nos pacientes diabéticos pode ser devido a uma diminuição na ativação da pré-calicreína ou a um aumento de sua síntese. Ainda não está esclarecido se o aumento nos níveis de pré-calicreína plasmática observado nos pacientes diabéticos é a causa da lesão renal, ou se é o resultado desta. No entanto, caso se confirme que a pré-calicreína é a causa da lesão renal, esta pode ser um marcador para a hipertensão e nefropatia em diabéticos insulino-dependentes.

1.5.4 Calicreínas teciduais

Entre as calicreínas teciduais humanas (hK1 a hK15) somente uma tem a habilidade de liberar eficientemente uma cinina bioativa, do LMWK (YOUSEF *et al.*, 2000). As calicreínas teciduais são expressas em vários tecidos incluindo os rins, as glândulas salivares, o pâncreas, a próstata, as mamas, o coração, os testículos, o útero e o sistema nervoso central (YOUSEF; DIAMANDIS, 2003). Presume-se que a maioria das calicreínas teciduais tenha atividade enzimática semelhante à da tripsina exceto três que provavelmente, tenham atividades semelhantes à da quimotripsina (YOUSEF; DIAMANDIS, 2002).

O gene da KLK1 expressa uma cadeia polipeptídica única, com 255 resíduos de aminoácidos. Destes, 17 resíduos, localizados na porção N-terminal constituem um peptídeo sinal que ao ser hidrolisado libera um peptídeo de dez resíduos de aminoácidos e o precursor inativo, a pré-calicreína, contendo 245 resíduos de aminoácidos. A hidrólise da ligação Arg⁷ – Ile⁸, na pré-calicreína, libera um peptídeo de sete resíduos de aminoácidos e a calicreína ativa (hK1), com 238 resíduos de aminoácidos (BHOOLA *et al.*, 1992). A enzima apresenta micro heterogeneidade com valores de pI variando entre 3,5 e 4,5. O seu centro ativo é semelhante ao da tripsina e inclui a tríade catalítica, Asp¹⁰², His⁵⁷, Ser¹⁹⁵ (BHOOLA *et al.*, 1992; ISHIDA; KATO, 2004).

A hK1 é relacionada à tripsina apresentando, uma mais alta especificidade para o sítio de quebra do seu substrato natural. A sua principal função bioquímica é a hidrólise altamente seletiva da proteína plasmática cininogênio de baixo peso molecular (LMWK) em duas ligações peptídicas para liberar estequiometricamente o decapeptídeo vasoativo e espasmogênico calidina (Lys – BK) (MIRANDA *et al.*, 1995). A calidina por sua vez, está envolvida no controle da pressão sanguínea, na manutenção do equilíbrio eletrolítico, na inflamação e em outros processos

fisiológicos. Acredita-se que a calicreína tecidual humana possa, também, catalisar a hidrólise de outros substratos como os fatores do crescimento, hormônios e citocinas (YOUSEF; DIAMANDIS, 2001). A hK1 catalisa, também a hidrólise de substratos sintéticos derivados da Arg e Lys N α -substituídas tais como, amidas, ésteres e peptídeos fluorogênicos (SOUSA *et al.*, 2002). Como outras serino-proteases, a hK1 é inibida por fluorofosfato de diisopropila (DFP) cujo fosfato combina-se irreversivelmente, com a Ser¹⁹⁵ do seu centro ativo. A hK1 é inibida também, por clorometilcetonas da Arg e da Lys que combinam-se com a His⁵⁷ do seu centro ativo. Outro inibidor da hK1 é o inibidor básico pancreático da tripsina (BPTI), também conhecido por Trasilol[®] ou inibidor pancreático da tripsina de Kunitz. A hK1 é inibida, ainda, pela benzamidina e a 4-aminobenzamidina que ocupam o subsítio S₁ da enzima (SCHECHTER & BERGER, 1967). Por outro lado, o inibidor da tripsina isolado de soja (BPTI) que inibe a tripsina, a calicreína plasmática e outras serino-proteases, não inibe a hK1 (GEIGER; FRITZ, 1981; SOUSA *et al.*, 2001). Experiências *in vitro* demonstraram que a hK1 é inibida, competitivamente, pelos cátions sódio, potássio, cálcio e magnésio e que a soroalbumina previne esta inibição (CHAO *et al.*, 1983; SOUSA *et al.*, 2001). Um importante inibidor da calicreína tecidual humana, a calistatina ou proteína ligadora da calicreína, foi descoberto, purificado e clonado por Chao e colaboradores (CHAO *et al.*, 1996). Entretanto, ainda não está comprovado que, *in vivo*, a hK1 seja a enzima alvo da calistatina (CHEN *et al.*, 2000).

Além de sua atividade cininogênica, a hK1 tem sido descrita por participar do processamento de fatores de crescimento e de hormônios peptídicos devido à sua presença na glândula pituitária, no pâncreas e em outros tecidos (DIAMANDIS; YOUSEF, 2002).

Segundo Bhoola *et al.* (1992), a hK1 hidrolisa a pró-insulina, a LDL, o precursor do fator natriurético atrial, o peptídeo vasoativo intestinal e a pró-colagenase. O

envolvimento da hK1 na homeostase da pressão sanguínea tem sido objeto de muita pesquisa.

Em 1934, Elliot e Nuzum descreveram a observação de que a excreção da caliceína urinária (hK1) era significativamente reduzida em indivíduos hipertensos. Segundo Chao e Chao, (1996), estudos epidemiológicos têm documentado uma relação inversa entre os níveis da caliceína renal ou urinária e a elevação da pressão sanguínea nos pacientes hipertensos. Ainda segundo estes autores, uma associação entre a reduzida excreção da atividade da caliceína tecidual (hK1) e a hipertensão tem sido relatada tanto em indivíduos brancos quanto em negros. Segundo Chao e Chao, (2004), os níveis da caliceína tecidual estão reduzidos em humanos e em animais modelos com hipertensão, doença cardiovascular e doença renal. A injeção do gene da hK1 resultou em uma prolongada redução da pressão sanguínea e a atenuação das hipertrofias e fibroses cardíaca e renal em vários animais modelos hipertensos.

Trabalho desenvolvido em nosso laboratório envolvendo 100 pacientes com hipertensão primária (26 brancos e 74 afrodescendentes), com idade compreendida entre 39 e 61 anos, e 89 indivíduos normotensos (31 brancos e 58 afrodescendentes), com idade compreendida entre 35 e 57 anos, como controles, revelou que a atividade amidásica da hK1 foi significativamente mais baixa na urina dos pacientes hipertensos do que na urina dos indivíduos controles. Por outro lado, não foi observada diferença estatisticamente significativa para a atividade amidásica da hK1 na urina de pacientes e controles brancos e afrodescendentes (BELO *et al.* 2009).

O envolvimento da hK1 no *diabetes mellitus* tem sido também objeto de estudo. Margolius, (1989), reportou que os dados referentes à participação da hK1 no *diabetes mellitus* eram conflitantes. Assim, segundo o autor, a excreção da caliceína urinária humana (hK1) é significativamente maior nos diabéticos dependentes de insulina mal controlados (hemoglobina A_{1c} > 11%) do que nos diabéticos dependentes de insulina bem controlados ou nos indivíduos saudáveis. O

controle glicêmico estaria associado a uma queda na excreção da hK1. Por outro lado, um estudo subsequente em diabéticos dependentes de insulina, mal controlados, não confirmou aqueles resultados. Em 2003, Emanuelli e Maddedu, reportaram que a angiogênese terapêutica foi proposta como uma alternativa para o tratamento da doença isquêmica resistente à terapia convencional. Os autores anunciaram o desenvolvimento de uma estratégia baseada na liberação local do gene da hK1 para a potenciação da microcirculação e a recuperação da isquemia periférica. Além disso, afirmaram os autores que, a hK1 previne e recupera a diminuição macrovascular causada pelo *diabetes mellitus*. Neste modelo, a hK1 foi capaz de estimular o crescimento vascular e contrastar a apoptose celular.

Em 2004, Emanuelli e Maddedu, reportaram que a angiogênese é essencial para a reparação de feridas e tecidos prejudicados pela isquemia. Os autores afirmam ter descoberto recentemente, que a hK1 nos músculos esqueléticos de diabéticos previne o desenvolvimento de microangiopatias e estimula a colaterização protegendo, assim, das consequências da oclusão arterial resultante.

Sabe-se que o sistema calicreína-cinina (SCC), o renina-angiotensina (SRA) e as prostaglandinas interagem para determinar as alterações hemodinâmicas renais presentes no *diabetes mellitus* (LEVINSKY,1979). Segundo Harvey *et al.*, (1992), o aumento da atividade da calicreína tecidual e da produção de prostaglandina E₂ deve contribuir para a vasodilatação renal e hiperfiltração em indivíduos diabéticos.

Estudos anteriores demonstraram que ratos com DM tipo 1, induzida por estreptozotocina e com grave hiperglicemia, apresentaram uma diminuição na síntese e excreção renal de calicreína (JAFFA *et al.*, 1987).

Mayfield *et al.* (1984), estudando pacientes com DM tipo 1, sem alterações renais e sem hipertensão, observaram em pacientes pobremente controlados, um aumento da excreção da caliceína urinária quando comparado com pacientes com bom controle glicêmico e com o grupo controle. Além disso, os pacientes com a taxa de excreção de caliceína elevada, após o controle da glicemia, apresentavam uma queda significativa na excreção da enzima.

Pelikánová *et al.* (1998), avaliando pacientes com DM tipo 1, recentemente acometidos pela doença e com controle inadequado da glicemia, observaram a diminuição da excreção da caliceína urinária e, também, uma pequena elevação da excreção desta após a administração de furosemida, um diurético, sob condições de hiperglicemia endógena.

Manto *et al.* (1993), demonstraram que as variações nas concentrações de caliceína e de cininas desempenham importante papel na alteração de fatores hemodinâmicos renais no DM do tipo 1.

Pesquisa desenvolvida em nosso laboratório envolvendo 35 pacientes com DM tipo 1, com glicemia mal controlada (Hb A_{1c} – 9,98%) e tratados com insulina e 34 indivíduos sadios como controles revelaram que a atividade amidásica da hK1 estava significativamente mais alta na urina dos pacientes do que na dos controles (MIRANDA, 2007).

1.5.5 Atividade enzimática das caliceínas teciduais

O centro ativo das caliceínas teciduais é formado por um sítio aniônico, um sítio hidrofóbico, um sítio catalítico e um sítio auxiliar (MARES-GUIA & DINIZ, 1970). O

centro ativo das calicreínas teciduais possui alta homologia com os centros ativos da tripsina, quimotripsina, elastase e outras serino proteases. A enzima conserva os aminoácidos His⁴¹, Asp⁹⁶ e Ser¹⁸⁹ da tríade catalítica das serino proteases, que forma uma importante configuração espacial responsável pela atividade catalítica. O sitio de especificidade, no qual se ligam eletrostaticamente grupos com cargas positivas de substratos e inibidores, também é preservado. Assim, a especificidade primária das calicreínas e de outras serino proteases pela arginina e lisina ocorre devido à presença do resíduo de ácido aspártico na posição 183, no subsítio S₁ (ASHLEY & MACDONALD, 1985).

Enzimaticamente, as calicreínas teciduais atuam por um mecanismo de proteólise limitada, hidrolisando as ligações peptídicas Met³⁷⁹-Lys³⁸⁰ e Arg³⁸⁹-Ser³⁹⁰, conforme numeração do pré-cininogênio humano, liberando a lisil-bradicinina (DEL NERY *et al.*, 1995). A calicreína tecidual do rato é a única exceção nessa classe de enzimas proteolíticas, pois hidrolisa a ligação Lys-Arg no cininogênio, liberando a bradicinina (CHAGAS *et al.*, 1992).

As calicreínas possuem alta especificidade pelo substrato natural, mas são capazes de hidrolisar substratos sintéticos derivados da arginina e da lisina N α -substituídas, dos tipos amida e éster. Assim, a atividade enzimática das calicreínas pode ser medida através de ensaios com substratos sintéticos, além de ensaios biológicos, imunoenaios e radioimunoensaio. Embora esses substratos derivados da arginina e da lisina N α -substituídas não sejam específicos para as calicreínas, são amplamente utilizados, devido à facilidade e à alta sensibilidade para se quantificar os produtos liberados, pois são capazes de detectar nanogramas de calicreína no ensaio (GEIGER & FRITZ, 1981).

A hK1, presente na urina, hidrolisa o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, liberando, assim, a 4-nitroanilina, uma substância de cor amarela, que possui absorção

máxima em 410 nm. As letras S_1 , S'_1 , S_2 , S_3 representam os subsítios no centro ativo da enzima, as letras P_1 , P_2 , P_3 representam as posições dos resíduos de aminoácidos no substrato e a letra P'_1 , a posição do grupo 4-nitroanilina ligado ao resíduo arginil (SCHECHTER & BERGER, 1967).

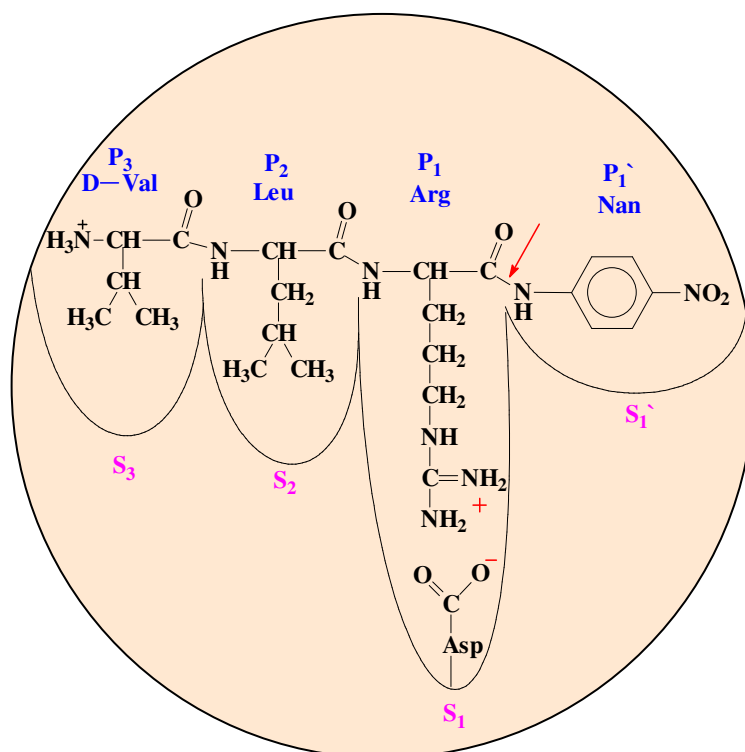


Figura 3 Interação da enzima hK1 com o substrato D-Val-Leu-Arg-Nan.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo geral determinar a atividade amidásica específica da calicreína tecidual humana na urina de pacientes com diabetes mellitus gestacional, que não utilizam insulina e de mulheres sadias gestantes e não gestantes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

– Selecionar as pacientes com diabetes mellitus gestacional (DMG), que não utilizam insulina, as gestantes normais, que servirão como controles para o DMG, e as mulheres sadias não-gestantes, que servirão como controles para as gestantes normais. Estas forneceriam as amostras de urina para o estudo.

– Determinar nas amostras de urina:

→ a atividade amidásica da hK1;

→ concentração de proteínas;

→ concentração de creatinina;

→ calcular o índice proteínas/creatinina;

→ calcular a atividade amidásica específica da hK1;

→ comparar os valores dos parâmetros, calculados acima, relativos às amostras das pacientes com DMG e das mulheres controles.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Considerando que:

– na dissertação de Mestrado de Gilmar Machado Miranda “Avaliação da atividade amidásica da calicreína tecidual humana na urina de indivíduos saudáveis e de pacientes com diabetes mellitus tipo 1” realizada no nosso laboratório, foram utilizados 34 pacientes diabéticos, fazendo uso de insulina, porém com glicemia descontrolada e 35 indivíduos saudáveis como controles foi observado que a atividade amidásica da calicreína tecidual humana foi significativamente maior na urina dos pacientes diabéticos do que na urina dos controles.

Foram selecionadas 90 mulheres, com base nos critérios de inclusão e exclusão para participarem deste estudo. Todas as mulheres participantes do projeto de pesquisa receberam esclarecimentos sobre os objetivos do projeto, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo) e foram agrupadas da seguinte forma:

- Grupo MG: constituído de 30 mulheres com diabetes mellitus gestacional, não usando insulina.
- Grupo controle 1 (controle para o DMG): constituído de 30 gestantes saudáveis;
- Grupo controle 2 (controle para a gestação): constituído de 30 mulheres saudáveis não gestantes;

As mulheres com diabetes gestacional participantes da pesquisa foram selecionadas pelos médicos Prof. Dr. Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior, Dra. Anelise Impelziere Nogueira, Dr. Ricardo Barsaglini da Silva Leite e Dr. Paulo Augusto Carvalho Miranda, no Ambulatório Borges da Costa da UFMG e no Ambulatório da Santa Casa de Belo Horizonte. E as gestantes saudáveis foram selecionadas no posto de saúde da Prefeitura de Belo Horizonte, quando iam

fazer seu controle pré-natal. E finalmente as não gestantes sadias foram selecionadas na Faculdade de Farmácia da UFMG.

Tabela 1 - Caracterização dos grupos de estudo

	Controle 1	Controle 2	DMG
N	30	30	30
Idade (anos)	24,6 ± 4,8	27,0 ± 4,3	32,7 ± 7,2

Grupo controle 1: gestantes sadias

Grupo controle 2: não gestantes sadias

Grupo DMG: pacientes com DMG

n (número de mulheres) e idade (valores expressos como média e desvio padrão).

3.1.1 Critérios de inclusão e de exclusão

Critérios de inclusão

- Mulheres com diagnóstico clínico de diabetes mellitus gestacional, na faixa etária de 18-42 anos, entre a vigésima quarta e a trigésima sétima semana de gestação, que não utilizam insulina.

Critérios de exclusão

- Mulheres apresentando alterações hepáticas, insuficiência renal e/ou outras patologias;
- Mulheres que forneceram volume insuficiente de urina ou amostra de urina apresentando bacteriúria e/ou hematúria.
- Mulheres portadoras de infecção urinária;

- Mulheres não grávidas com índice de massa corpórea (IMC) maior que 30 Kg/m²;
- Mulheres grávidas que antes da gravidez apresentavam IMC maior que 30 Kg/m²;
- Gestantes com DMG que utilizavam insulina.

3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

As pacientes com DMG e as mulheres sadias controles selecionadas que aceitaram participar do presente estudo receberam, nos ambulatórios, um frasco de plástico de boca larga, com tampa de rosca devidamente identificado com o nome da participante. Cada frasco, com capacidade para 100 ml, continha 100 microlitros de solução de azida de sódio a 10% (p/v), para evitar a proliferação de microorganismos na urina colhida. Cada participante recolheu o jato médio de uma amostra aleatória de urina. As amostras de urina foram, então, encaminhadas ao Laboratório de Enzimologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

No laboratório, as amostras de urina foram testadas com uma tira reagente para a detecção do pH e densidade e para a pesquisa da possível presença de sangue, bilirrubina, urobilinogênio, cetona, proteína, nitrito, glicose e leucócitos. As amostras que apresentavam interferentes foram descartadas. Em seguida, retirou-se de cada amostra de urina, aprovada pelo teste da urofitá, 5 mL, que foram armazenados no refrigerador até o momento da dosagem de creatinina. O restante de cada amostra de urina teve o seu valor de pH elevado para 8,0, pela adição de algumas gotas de solução de hidróxido de sódio 6 M. O pH da urina foi elevado para precipitar a proteína de Tamm Horsfall, uma glicoproteína presente na urina, que deve ser separada para evitar a sua precipitação, o que poderia causar interferência no resultado da dosagem enzimática. Após a precipitação da glicoproteína, as amostras de urina foram filtradas em papel filtro qualitativo e os

filtrados submetidos às dosagens fotométricas de proteínas e da atividade amidásica da hK1.

3.3 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Ácido acético glacial (Anidrol Produtos Químicos Ltda.®)
- Ácido fosfórico a 85% (v/v) (Quimex.®)
- Álcool etílico 96% (v/v)
- Azida sódica (Sigma® , USA)
- Banho-maria Unitemp® com controlador microprocessado modelo 116B
- Conjunto de reagentes para a dosagem da Creatinina (Bioclin-Quibasa®)
- Coomassie brilliant blue G-250 (Riedel-deHaen®, Alemanha)
- Cronômetro Technos®
- Espectrofotômetro Shimadzu® UV – 160 A
- Glicina (Sigma® , USA)
- H-D-valil-L-leucil-L-arginina p-nitroanilina (D-Val-Leu-Arg-Nan) (Chromogenix®, Suécia)
- Hidróxido de sódio (Sigma®,USA)
- Papel de filtro qualitativo
- Pipetas automáticas
- Potenciômetro Micronal® B 374
- Soroalbumina bovina (BSA) (Sigma®,USA)
- Trasilol® (Bayer®, Brasil)
- Tiras para urinálise Biocolor®

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Determinação da atividade amidásica da calicreína tecidual humana (hK1)

A atividade amidásica da calicreína tecidual humana foi determinada segundo Geiger & Fritz (1981) e Erlanger *et al.* (1961). O substrato D-Val-Leu-Arg-Nan, denominado comercialmente como S-2266TM, liofilizado (frasco contendo 25 mg) foi reconstituído em 4,313 mL de água mili-Q, sendo obtida assim, uma solução estoque de concentração 0,01M. Esta solução foi alíquotada e congelada. Para ser utilizada na incubação, a solução estoque foi diluída em tampão glicina NaOH 200 mM, pH 9,0, dando origem à solução de uso, com concentração de 160 µM.

As incubações foram realizadas em quadruplicata, à 37°C, e os reagentes adicionados conforme o quadro abaixo:

Tubos	Tampão (µL)	Trasilol (µL)	Filtrado (µL)	Pré - incubações	Substrato (µL)	Incubações	HAc (µL)
CS	600	-	-	10min/37°C	400	30min/37°C	100
CST	500	100	-	10min/37°C	400	30min/37°C	100
CF	500	-	500	10min/37°C	-	30min/37°C	100
F	100	-	500	10min/37°C	400	30min/37°C	100
F + T	-	100	500	10min/37°C	400	30min/37°C	100

Onde CS = controle do substrato; CST = controle do substrato + solução de Trasilol®; CF = controle do filtrado; F = filtrado; F + T = filtrado + solução de

Trasilol® a 1.000 UIC/mL (unidades inibidoras de calicreína); HAc = ácido acético a 60% (v/v). Após o intervalo de 30 minutos de incubação, a solução de ácido acético a 60% (v/v) foi adicionada, para paralisar as reações. Para zerar o aparelho, utilizou-se o tampão glicina NaOH 200 mM, pH 9,0 como solução controle ou branco. A concentração final do substrato no ensaio foi de 60 μ M, sendo assim, aproximadamente 5 vezes maior do que o seu K_m , cujo valor é de 10,3 μ M, conforme Sousa *et al.* (2002).

A atividade amidásica da calicreína tecidual humana, em μ M . min⁻¹ . 500 μ L⁻¹ de urina, foi monitorada pela medida da absorvância em 410 nm da 4-nitroanilina (4-NAn) liberada ($\epsilon_{410} = 8.800 \text{ M} \cdot \text{cm}^{-1}$) (ERLANGER *et al.*, 1961), em espectrofotômetro Shimadzu® UV-160 A e determinada utilizando-se a equação:

$v = \Delta A_{410} \times 1,1 \times 1/8.800 \times 1/30$, onde,

v = velocidade da reação (μ M . min⁻¹ . 500 μ L⁻¹)

ΔA_{410} = leitura da absorvância em 410 nm da mistura de incubação, contendo o substrato e o filtrado, menos a soma das leituras das absorvâncias das misturas de incubação, contendo o substrato, o Trasilol® e o filtrado;

1,1 = fator de correção para o volume (volume da mistura, cuja absorvância foi lida, dividido pelo volume da mistura de incubação, ou seja, 1.100 μ L/1.000 μ L);

8.800 = absortividade molar da 4-nitroanilina;

30 = tempo de incubação em minutos.

Esta atividade amidásica era convertida para μ M . min⁻¹ . mL⁻¹ de urina.

3.4.2 Determinação de proteínas

Proteínas foram determinadas segundo o método de Bradford (1976) modificado por Peterson (1983). O princípio deste método baseia-se na ligação das proteínas ao corante Coomassie® brilliant blue G-250. A ligação do corante à proteína leva

a uma alteração na absorção máxima do corante de 465 nm para 595 nm, sendo a absorção da mistura de reação monitorada em 595 nm.

O reagente de cor foi preparado dissolvendo-se 25 mg do Coomassie[®] brilliant blue G-250 em 12,5 mL de etanol a 96% (v/v), adicionando-se a esta solução, 25 mL de ácido fosfórico a 85% (v/v) (Quimex[®]), e água Mili-Q para completar o volume para 250 mL. Esta solução foi armazenada a 4 °C e filtrada em papel de filtro qualitativo no momento do uso. Como padrão protéico, utilizou-se uma solução de soroalbumina bovina (BSA). Para tanto, foi preparada uma solução estoque de BSA a 0,5 mg/mL. Esta concentração foi corrigida pela leitura da absorvância da solução em 280 nm. A partir da solução estoque, foram preparados dois padrões protéicos de concentrações 0,0025 mg/mL e 0,050 mg/mL, em um volume final de 0,5 mL de água Mili- Q.

As dosagens foram realizadas em quadruplicata, e incubadas à temperatura ambiente, durante 15 minutos, conforme o quadro abaixo:

Tubos	Água Mili-Q (mL)	Padrão 1 (mL)	Padrão 2 (mL)	Filtrado (mL)	Reagente de cor (mL)
B	0,5	-	-	-	2,0
CF	2,0	-	-	0,5	-
P ₁	-	0,5	-	-	2,0
P ₂	-	-	0,5	-	2,0
F	-	-	-	0,5	2,0

Onde: B = branco; CF = controle do filtrado; P₁ = padrão 1 (0,0025 a 0,05 mg/mL); P₂ = padrão 2 (0,0025 a 0,05 mg/mL); F = filtrado.

O espectrofotômetro foi zerado com água Mili-Q para a leitura da absorvância do

controle do filtrado (CF), e zerado com o branco (B), para as leituras de absorvâncias das demais misturas.

Os valores das absorvâncias foram convertidos em mg/mL de proteína, utilizando-se a equação 1.0, descrita por PETERSON (1983).

$$P = b \cdot A (1 - a \cdot A)^{-1} \quad (1.0)$$

Sendo:

$$a = A^{-1} - b \cdot P^{-1} \quad (1.1)$$

$$b = (A_l^{-1} - A_h^{-1}) / (P_l^{-1} - P_h^{-1}) \quad (1.2)$$

$$A^{-1} = (A_l^{-1} + A_h^{-1}) / 2 \quad (1.3)$$

$$P^{-1} = (P_l^{-1} + P_h^{-1}) / 2 \quad (1.4)$$

Onde:

P = concentração em proteínas na amostra

A = absorvância da amostra

A_l = absorvância do padrão de menor concentração

A_h = absorvância do padrão de maior concentração

P_l = concentração do padrão de menor concentração (mg/mL)

P_h = concentração do padrão de maior concentração (mg/mL)

A concentração de proteínas era convertida de mg/mL para µg/mL.

3.4.3 Determinação de creatinina

As dosagens de creatinina foram realizadas nas amostras de urina retiradas antes de se corrigir o pH, pelo método de Jaffé, utilizando-se um Kit de reagentes, seguindo-se a metodologia descrita nas instruções do fabricante. A reação baseia-se na ligação do ácido picrico à creatinina em meio alcalino, formando-se complexos corados com um máximo de absorção em 510 nm. Após a incubação e a leitura da absorvância (A₁), foi adicionado, à mistura um acidificante para desfazer o complexo creatinina-picrato, deixando-se assim, intactos os complexos

cromógenos-picrato, cuja absorvância (A_2) foi então lida novamente. A diferença entre as duas leituras fornece o valor real da concentração de creatinina na amostra.

3.4.4 Análise química da urina

A triagem para a detecção de substâncias anormais na urina foi realizada utilizando-se urofitas reagentes, Urofitas 10[®] seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

3.4.5 Atividade amidásica específica da hK1

A atividade amidásica específica da hK1 expressa em $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de creatinina foi obtida dividindo-se a velocidade da reação enzimática ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$) pela concentração de creatinina ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) presente no filtrado de urina adicionada à mistura de incubação.

3.4.6 Índice proteína/creatinina

O índice proteína/creatinina expresso em $\mu\text{M} \cdot \text{mim}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de creatinina foi calculado para cada amostra dividindo-se o valor da proteína ($\mu\text{g}/\text{mL}$) pelo valor da creatinina (mg/mL).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizando-se o programa SAS[®], versão 8, inicialmente realizou-se um teste de normalidade, onde verificou-se que os dados do estudo estavam fora da normalidade, com variáveis não-paramétricas. Assim realizou-se uma análise de variância não-paramétrica, através do teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os resultados dos grupos estudados foram expressos pelos valores das medianas. E o nível de significância adotado foi de 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 EXCREÇÃO URINÁRIA DE PROTEÍNA, CREATININA, ÍNDICE PROTEÍNA/CREATININA E VALORES DE ATIVIDADE AMIDÁSICA ESPECÍFICA DA hK1

Os valores de proteína, creatinina e o índice proteína/creatinina urinários para o grupo DMG e os grupos controle 1 e 2 estão apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4. Todos estão representados pelos valores das medianas. Cada grupo é constituído por 30 mulheres sendo:

- Grupo DMG: pacientes com diabetes mellitus gestacional;
- Grupo controle 1 (controle para o DMG): gestantes sadias;
- Grupo controle 2 (controle para a gestação): não gestantes sadias.

Tabela 2 - Valores urinários de proteína, creatinina, índice proteína/creatinina e atividade amidásica específica da hK1 nos grupos DMG e Controle 1

	DMG	Controle 1	P
Proteína ^a	129 (75; 198)	59 (46; 104)	0,002*
Creatinina ^b	0,74 (0,45; 1,20)	0,67 (0,40; 1,11)	0,063
Índice prot/crea ^c	173 (113; 237)	100 (72; 150)	0,000*
Ativ. amid.esp. ^d	0,40 (0,24; 0,66)	0,27 (0,15; 0,50)	0,050*

^a $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; ^b $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; ^c $\mu\text{g prot} \cdot \text{mg}^{-1} \text{crea}$, ^d $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{crea}$. Valores das medianas, e os números entre parênteses representam os valores do primeiro e terceiro quartis respectivamente. O símbolo (*) indica que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

Tabela 3 - Valores urinários de proteína, creatinina, índice proteína/creatinina e atividade amidásica específica da hK1 nos grupos DMG e Controle 2

	DMG	Controle 2	P
Proteína ^a	129 (75; 198)	33 (23; 49)	0,000*
Creatinina ^b	0,74 (0,45; 1,20)	1,02 (0,66; 1,33)	0,063
Índice prot/crea ^c	173 (113; 237)	34 (27; 43)	0,000*
Ativ. amid.esp. ^d	0,40 (0,24; 0,66)	0,29 (0,20; 0,38)	0,050*

^a $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; ^b $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; ^c $\mu\text{g prot} \cdot \text{mg}^{-1} \text{crea}$, ^d $\mu\text{M} \cdot \text{mim}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{crea}$. Valores das medianas, e os números entre parênteses representam os valores do primeiro e terceiro quartis respectivamente. O símbolo (*) indica que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

Tabela 4 - Valores urinários de proteína, creatinina, índice proteína/creatinina e atividade amidásica específica da hK1 nos grupos Controle 1 e Controle 2

	Controle 1	Controle 2	P
Proteína ^a	59 (46; 104)	33 (23; 49)	0,000*
Creatinina ^b	0,67 (0,40; 1,11)	1,02 (0,66; 1,33)	0,063
Índice prot/crea ^c	100 (72; 150)	34 (27; 43)	0,0001*
Ativ. amid. esp. ^d	0,27 (0,15; 0,50)	0,29 (0,20; 0,38)	0,825

^a $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; ^b $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; ^c $\mu\text{g prot} \cdot \text{mg}^{-1} \text{crea}$, ^d $\mu\text{M} \cdot \text{mim}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{crea}$. Valores das medianas, e os números entre parênteses representam os valores do primeiro e terceiro quartis respectivamente. O símbolo (*) indica que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

A Figura 4 ilustra a distribuição dos dados obtidos para os valores de creatinina urinária nos grupos pesquisados. Esta figura apresenta os valores de creatinina,

expressos em $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as mulheres do estudo.

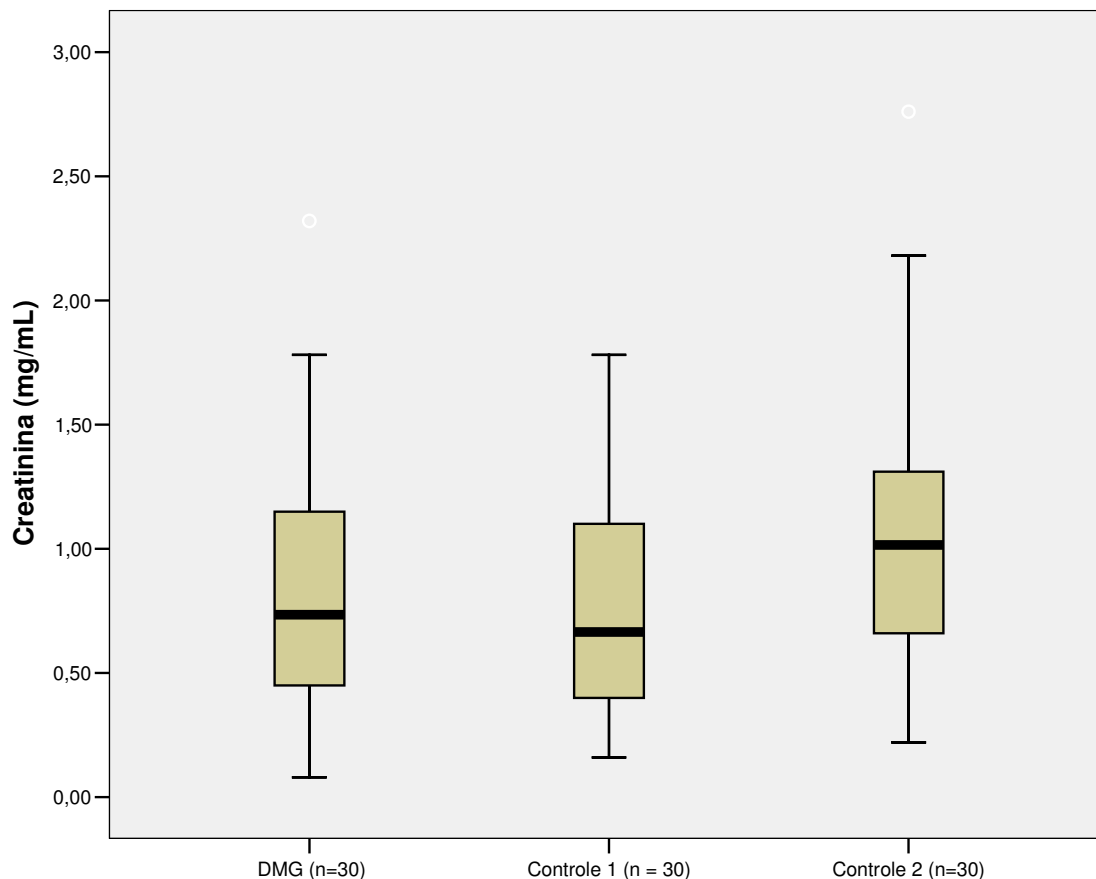


Figura 4 – Distribuição dos valores de creatinina urinária entre os grupos avaliados.

DMG = mulheres com o diabetes gestacional; Controle 1 = gestantes sadias; Controle 2 = não gestantes sadias.

A Figura 5 apresenta a distribuição dos resultados dos índices proteína/creatinina urinários em $\mu\text{g} \text{ prot} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ creat}$. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre as mulheres dos três grupos do estudo.

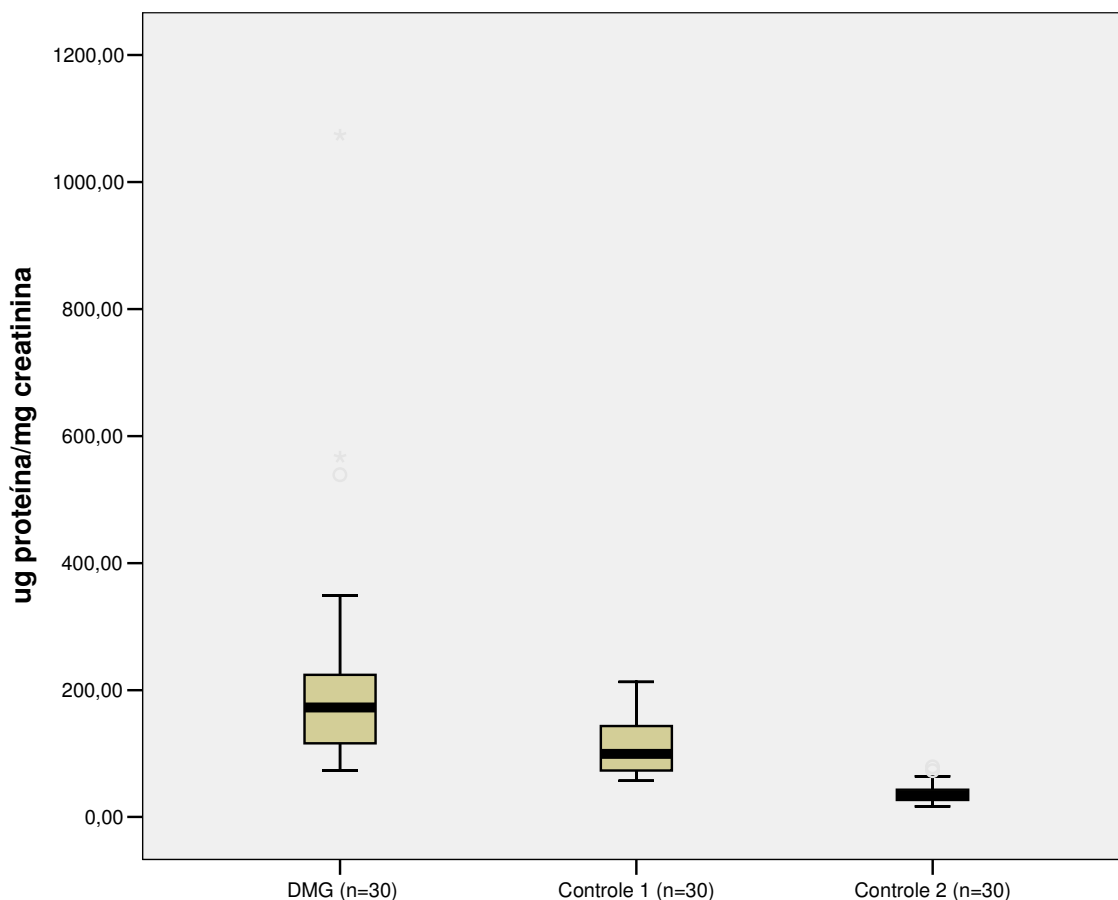


Figura 5 – Distribuição dos valores dos índices proteína/creatinina urinários entre os grupos avaliados.

DMG = mulheres com o diabetes gestacional; Controle 1 = gestantes sadias; Controle 2 = não gestantes sadias.

O símbolo ● representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

A Figura 6 apresenta a distribuição dos resultados das atividades amidásicas específicas da hK1 em $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ creat.}$ Foi observada diferença estatisticamente significativa entre as mulheres do grupo DMG e as mulheres dos dois grupos controles.

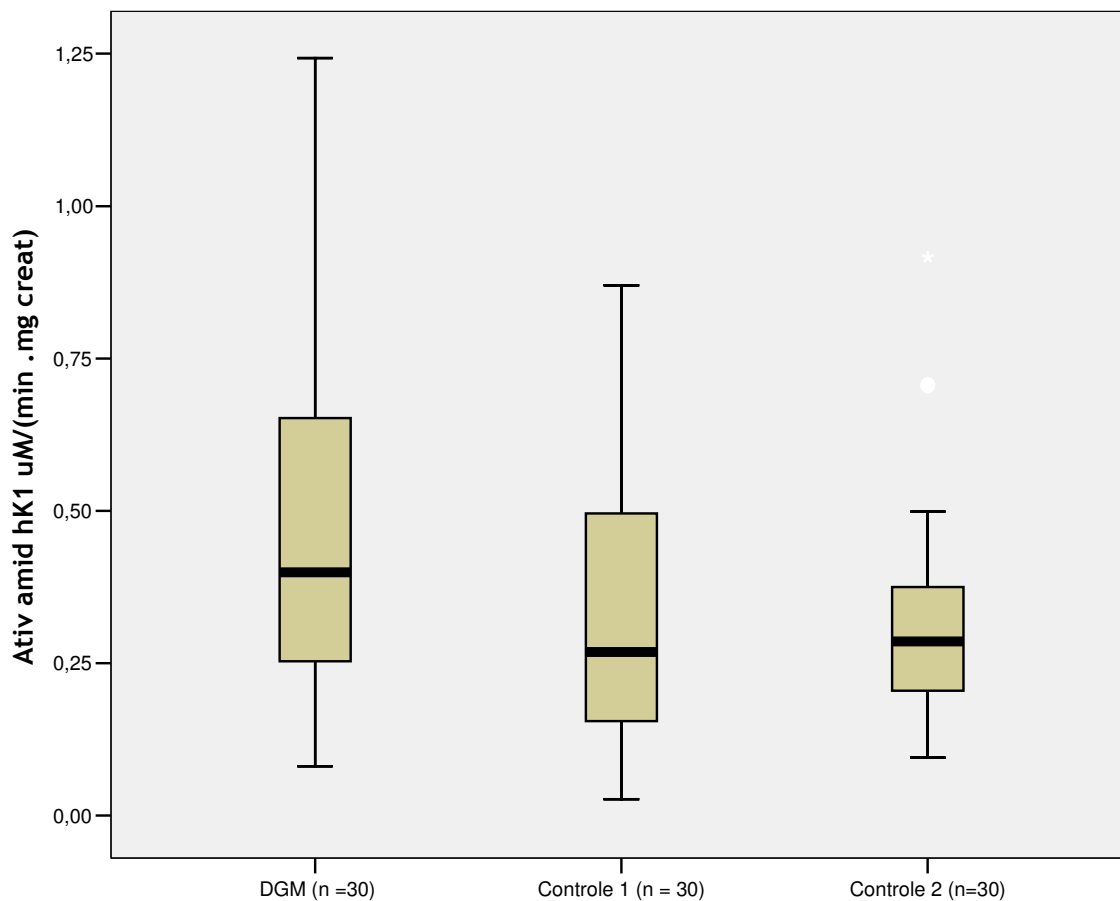


Figura 6 – Distribuição dos valores de atividade amidásica específica da hK1 urinária entre os grupos avaliados.

DMG = mulheres com o diabetes gestacional; Controle 1 = gestantes saudáveis; Controle 2 = não gestantes saudáveis.

O símbolo ● representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

5 DISCUSSÃO

5.1 EXCREÇÃO URINÁRIA DE PROTEÍNA, CREATININA E ÍNDICE PROTEÍNA/CREATININA

As proteínas excretadas na urina são constituídas, principalmente de albumina e de algumas proteínas menores assim como outras proteínas secretadas pelos túbulos renais dentre as quais, a glicoproteína de Tamm Horsfall é uma das principais. Somente uma pequena quantidade de proteína é excretada normalmente na urina ($20 - 150 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$) sendo a maior parte representada pela albumina, que devido à sua maior concentração no filtrado não é completamente reabsorvida pelas células tubulares. O restante é constituído quase que completamente pela glicoproteína de Tamm-Horsfall ou Uromucóide, provavelmente secretada pelas células dos túbulos distais (JONHSON, 2006).

Além disso a proteinúria pode ocorrer como um resultado de febre, exercício físico, exposição ao frio ou relacionada à postura. Estas alterações esporádicas podem causar dificuldades interpretativas quando se suspeita de alguma patologia. A postura de pé aumenta a excreção de proteína tanto nos indivíduos saudáveis quanto naqueles com doença renal. Se for postural, desaparece durante o repouso e estará ausente na amostra da primeira urina matinal (JONHSON, 2006). Encontra-se na literatura, uma extensa discussão sobre a amostra de urina adequada para a investigação da excreção de proteínas. Geralmente reconhece-se que uma amostra colhida durante 24 horas é a maneira definitiva de demonstrar a presença de proteinúria. Embora a urina colhida durante 24 horas, seja a amostra de referência, é amplamente aceito que este é um procedimento difícil de ser controlado. Existem estudos que mostram que mais de 25% das amostras de 24 horas são desprezadas por suspeita de má coleta. Entretanto, amostras colhidas da primeira urina da manhã, da segunda urina da manhã ou aleatoriamente também têm sido utilizadas. Uma vez que a excreção de creatinina urinária é praticamente constante durante o período de 24 horas, a medida da

relação proteína/creatinina ou albumina/creatinina normaliza para as variações da concentração urinária.

Vários autores têm recomendado o uso do índice proteína/creatinina baseando-se na boa correlação que ela demonstra com a amostra colhida durante 24 horas. Em geral a proteinúria, presença de proteínas na urina, reflete a albuminúria (LAMB *et al.*, 2006).

No presente estudo, devido às dificuldades encontradas para a coleta da primeira urina da manhã, utilizou-se para as análises, uma amostra de urina aleatória, coletada nos próprios ambulatórios após a seleção das participantes da pesquisa.

A microalbuminúria é definida através de uma relação albumina/creatinina entre 30 – 300 $\mu\text{g}/\text{mg}$, tanto em homens quanto em mulheres, concentrações estas não detectáveis pelos testes clínicos qualitativos como urofitas fornecidas para a detecção de proteínas totais (ADA, 2006).

Com a utilização de novas tecnologias, as baixas concentrações de albumina podem, agora, ser medidas e a microalbuminúria é, assim, considerada um indicador clinicamente importante da deterioração da função renal nos indivíduos diabéticos. Atualmente as sociedades européias e norteamericanas aceitam que exames regulares da excreção urinária de albumina sejam uma conduta valiosa no monitoramento de ambos os tipos de diabetes 1 e 2 (LAMB *et al.*, 2006).

Tem-se sugerido que a identificação de pacientes diabéticos em risco de desenvolver nefropatia deveria ser buscada antes que o estágio microalbuminúrico seja instalado quando então já se pode ser muito tarde para a prevenção da nefropatia. Uma vez que a microalbuminúria tenha sido estabelecida, um inibidor da enzima conversora de angiotensina pode ser prescrito porque esta classe de

agentes anti-hipertensivos tem notáveis efeitos antiproteinúria além do efeito sobre a pressão sanguínea (LAMB *et al.*, 2006).

De acordo com a literatura, indivíduos com glicemia elevada, excretam menores quantidades de proteína e creatinina do que indivíduos saudáveis com glicemia normal. Nos rins a glicose filtrada é quase que completamente reabsorvida nos túbulos proximais, mas em concentrações maiores do que 180 mg/dL (limiar de reabsorção da glicose) ocorre saturação do mecanismo de reabsorção, levando à eliminação de glicose e aumentando, assim, a excreção de água (diurese osmótica) provocando a poliúria (SOUSA, 2003).

Analisando os resultados apresentados nas tabelas 2, 3 e 4, a partir do índice proteína/creatinina calculado, verifica-se que as pacientes com DMG excretam significativamente mais proteína expressa como índice de proteína/creatinina (173 µg/mg) (Tabela 2) do que as mulheres gestantes saudáveis (100 µg/mg) (Tabela 2) e as não gestantes saudáveis (34 µg/mg) (Tabela 4). Estes valores indicam uma possível microalbuminúria (30 – 300 µg/mg) entre as mulheres participantes do estudo. De acordo com Van de Wal *et al.*, a prevalência de microalbuminúria na população em geral está entre 6% a 8%, enquanto que em pacientes com hipertensão e diabetes esta porcentagem aumenta para 10% a 15% e 15 a 20%, respectivamente. As gestantes saudáveis apresentaram um índice proteína/creatinina significativamente maior que as não gestantes saudáveis. Segundo Neme (2006), são profundas as adaptações anatômicas, fisiológicas e bioquímicas que acontecem na mulher no curto espaço de tempo da gravidez. E uma das modificações ocorre no aparelho urinário da gestante. Há um aumento da fração de filtração glomerular, onde maior quantidade de solutos do plasma atravessam o glomérulo por unidade de tempo. Esse aumento do filtrado glomerular poderia explicar a proteinúria na gestante.

Não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os valores de creatinina urinários para as pacientes com DMG e as mulheres dos grupos controles 1 e 2. Apenas observou-se diferença estatisticamente significativa para os valores de creatinina urinários entre as mulheres dos grupos controles 1 e 2. As gestantes sadias apresentaram valores de excreção urinária de creatinina (0,67 mg/mL) menores em relação às não gestantes sadias (1,02mg/mL) (Tabela 4). Segundo Coelho (2004), durante a gravidez normal ocorre um aumento da filtração glomerular e, como consequência, a concentração de creatinina sérica se eleva.

5.2 VALORES DE ATIVIDADE AMIDÁSICA ESPECÍFICA DA hK1 NO GRUPO DMG E NOS GRUPOS CONTROLES 1 E 2

A calicreína tecidual humana foi quantificada na urina por meio de ensaio fotométrico utilizando o substrato sintético D-val-Leu-Arg-Nan. Segundo Lamb *et al.* (2006), uma vez que a excreção da creatinina na urina é praticamente constante durante às 24 horas do dia, a medida da relação proteína/creatinina corrige as variações na concentração urinária. Assim, com o objetivo de expressar a atividade amidásica específica da hK1 independentemente das variações que ocorrem na concentração da urina, calculou-se a atividade amidásica específica dividindo-se a atividade amidásica pelo teor de creatinina na amostra de urina utilizada no ensaio.

Mayfield *et al.* (1984) avaliaram a excreção da calicreína urinária humana (hK1), por radioimunoensaio, e medida da sua atividade esterásica em indivíduos sadios, em pacientes com DM1 com controle glicêmico adequado e em pacientes com DM1 com a glicemia pobremente controlada. Todos os pacientes não eram hipertensos e não apresentavam alterações renais. Os autores observaram que os pacientes DM1 com a glicemia não controlada excretavam mais calicreína do que

os indivíduos sadios e os pacientes DM1 com controle glicêmico adequado. Ainda segundo os autores, os pacientes com a glicemia pobremente controlada, apresentaram uma redução dos níveis de excreção da caliceína, quando foram submetidos a um bom controle glicêmico.

Manto *et al.* (1993), reportaram que em pacientes com DM tipo 1 e com hiperfiltração glomerular a excreção urinária de caliceína está elevada quando comparada com a excreção em pacientes diabéticos com normofiltração glomerular e em indivíduos controles. Os autores observaram, ainda, uma correlação positiva entre o ritmo de filtração glomerular (RFG) e a excreção da caliceína urinária. Considerando esta correlação positiva, os autores admitem que a elevação na excreção da caliceína urinária represente um marcador da fase inicial da nefropatia diabética. Eles não encontraram diferença estatisticamente significativa entre a excreção da caliceína urinária, a idade, o sexo e a duração do diabetes nos grupos de normofiltrantes e hiperfiltrantes glomerulares, respectivamente.

Miranda (2007), em um estudo, com 34 pacientes diabéticos (DM1), diagnosticados há até cinco anos com controle inadequado da glicemia (Hb A1c = 9,98%) e fazendo uso de insulina e 35 indivíduos sadios que compunham o grupo controle, encontrou no grupo dos pacientes valores de atividade amidásica específica da hK1 significativamente maiores que os valores apresentados pelos indivíduos do grupo controle. Como os seus pacientes tinham a glicemia alterada e utilizavam insulina, Miranda (2007) não pode indicar se o aumento da atividade amidásica específica da hK1 era relacionado à glicemia alterada ou à insulina administrada.

A análise dos resultados apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4, revela que as pacientes com DMG apresentaram valores de mediana para a atividade amidásica específica da hK1 na urina ($0,40 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de creatinina) significativamente maiores do que os valores apresentados pelas gestantes sadias ($0,27 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot$

mg⁻¹ de creatinina) e pelas não gestantes sadias (0,29 μM . mim¹ . mg⁻¹ de creatinina). E que não houve diferença significativa entre as medianas das atividades amidásicas específicas da hK1 nas urinas das mulheres dos grupos controles 1 e 2.

Segundo Mayfield *et al.* (1984), as razões para o aumento da excreção de caliceína em pacientes com glicemia elevada ou os mecanismos responsáveis pela correção desta excreção com o controle da glicemia ainda são incertas. Levando em consideração que as pacientes deste estudo apresentavam uma glicemia aumentada em relação à normalidade e não faziam uso de insulina até o momento da coleta da urina, sugere-se que o que leva a um aumento da excreção urinária de hK1 seja a glicemia elevada.

5.3 PERSPECTIVAS

A avaliação da atividade amidásica da hK1 urinária no DM iniciou-se em nosso laboratório, em pacientes portadores de DM tipo 1 com glicemia alterada e em uso de insulina. Tendo sido observado um aumento na atividade amidásica da hK1 na urina dos pacientes.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de aprofundar os conhecimentos sobre o comportamento enzimático da hK1 na urina desta vez com pacientes com DMG que não usavam insulina. Afim de se verificar a influência da glicemia ou da insulina sobre a atividade da hK1 urinária.

Considerando que neste trabalho a glicemia alterada mostrou-se responsável pelo aumento da atividade enzimática da hK1, tem-se como perspectiva a necessidade de se medir a atividade amidásica específica da hK1 urinária das pacientes com

DMG, após o parto quando a glicemia já estiver normalizada, com o objetivo de se verificar então os níveis da atividade enzimática da calicreína nesta fase.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo sugerem que a glicemia elevada é responsável pelo aumento da atividade amidásica específica da calicreína tecidual humana na urina das mulheres com diabetes mellitus gestacional.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION – ADA. Disponível em: <http://www.diabetes.org/home>. Último acesso em 2009.

ASHLEY, P. L.; MACDONALD, R. J. Kallikrein-Related mRNAs of the rat submaxillary gland: nucleotide sequences of four distinct types including tonin. *Biochemistry*, Washington Dc, v. 24, p. 4512-4520.

BEIERWALTES, W.H.; PRADA, J.; CARRETERO, O. A. Effect of glandular kallikrein on renin release in isolated rat glomeruli. *Hypertension*, v. 7, p. 27-31, 1985.

BELO, A. A.; Avaliação do papel da caliceína tecidual humana como um dos fatores na regulação da pressão sanguínea. 2004. 97f. (*Mestrado em Ciências Farmacêuticas*) , Faculdade de Farmácia - UFMG, Belo Horizonte, 2004.

BELO, A. A., SOUSA, M. O., MACHADO, E. L. G., FIGUEIREDO, A. F. S. On human tissue kallikrein activity in urine of brazilian white and black primary hypertensive patients. *Ethnicity and Disease* (aceito para publicação).

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 238-245, 1976.

BHoola, K. D.; Figueroa, C. D.; Worthy, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacological reviews*, Baltimore, v. 44, n. 1, p. 1-80, 1992.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 238-245, 1976.

BUCHANAN, T.A.; ANNY H. XIANG. Gestational diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 115:485–491, 2005.

CAMPBELL, D.J. The kallikrein-kinin system in humans. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, Carlton, v. 28, p. 1060-1065, 2001.

CHAGAS, J. R.; HIRATA, I. Y.; JULIANO, M. A.; XIONG, W.; WANG, C.; CHAO, J.; JULIANO, L.; PRADO, E. S. Substrate specificities of tissue kallikrein and T-Kininogenase: Their possible role in kininogen processing. *Biochemistry*, Washington Dc, v. 31, p. 4969-4974, 1992.

CHAO, J.; TANAKA, S.; MARGOLIUS, H. S. Inhibitions effects of sodium and other monovalent cations on purified versus membrane-bound kallikrein. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 258, n. 10, p. 6461-6465, 1983.

CHAO, I.; CHAI, K. X.; CHAO, L. Tissue kallikrein inhibitors in mammals. *Immunopharmacology*, New York, v. 32, p. 67-72, 1996.

CHAO, J.; CHAO, L. Kallikrein-kinin in stroke, cardiovascular and renal disease. *Experimental physiology*, Cambridge, v. 90, p. 291-298, 2004.

CHEN, V. C.; CHAO, L.; CHAO, J. Roles of the P1, P2 and P3 Residues in Determining Inhibitory Specificity of Kallistatin toward Human Tissue Kallikrein. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 275, n. 49, p. 38457-38466, 2000.

COELHO, Tarcísio Mota *et al.* Proteinúria nas síndromes hipertensivas da gestação: prognóstico materno e perinatal. *Rev. Assoc. Med. Bras.* - São Paulo, v. 50, n. 2, 2004.

DEL NERY, E.; CHAGAS, R. J.; JULIANO, M. A.; PRADO, E. S.; JULIANO, L. Evaluation of the extent of the binding site in human tissue kallikrein by syntetic substrates with sequences of human kininogen fragments. *Biochemistry*, Washington Dc, v. 312, p. 233-238, 1995.

DAVID, B. S. Carbohydrates. In: Carl A. Burts, Edward R. Ashwood e David. E. Burns (eds). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4th edition. St. Louis – Missouri USA: Elsevier Saunders, Cap. 25, p. 837 – 901, 2006.

DAVIDSON, M.B. Complicações do diabete melito-implicações para os cuidados primários. *Diabetes Mellitus*. 4^o ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, Cap 8, p.239-276, 2001.

DAVIDSON, M.B. Diagnóstico e classificação do diabete melito. *Diabetes Mellitus*. 4^o ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 2001. Cap 1, p.1-13.

DAVIS, S.N.; GRANNER, D.K. Insulina, fármacos hipoglicemiantes orais e a farmacologia do pâncreas endócrino. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (ED.). *Goodman & Gilman – as bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1996. Cap. 60, p. 1103-1125.

DIAMANDIS, E.P.; YOUSEF, G.M. Human tissue kallikrein: a family of new cancer biomarkers. *Clinical Chemistry*, v. 48, n. 8, p. 1198-1205, 2002.

ELLIOT, R.; NUZUM, F. R. Urinary excretion of a depressor substance (Kallikrein of Frey & Kraut) in arterial hypertension. *Endocrinology*, Springfield, v. 18. P. 462-474, 1934.

EMANUELI, C.; MADDEDU, P. Angiogenesis therapy with human tissue kallikrein for the treatment of ischemic diseases. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*, Paris, v. 97, p. 679-687, 2004.

FIGUEIREDO, E. L. Avaliação do papel da caliceína tecidual humana em pacientes com insuficiência cardíaca. 2004. 107f. (*Mestrado em Clínica Médica*), Faculdade de Medicina - UFMG, Belo Horizonte, 2004.

GEIGER, R.; FRITZ, H. Human urinary kallikrein. *Methods in Enzymology*, v. 80 p. 466-492, 1981.

GREENBAUM, M.; OKAMOTO, H. T-Kinin and T-Kininogen. *Methods in Enzymology*, New York, v. 163, p. 272-281, 1988.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Insulina, glugacon e diabetes mellitus. *Tratado de fisiologia médica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. Cap. 78, p. 883-894.

HATALA, M.A.; DIPIPO, V.A.; POWERS, C.A. Biological thiols elicit prolactin proteolysis by glandular kallikrein and permit regulation by biochemical pathways linked to redox control. *Biochemistry*, Washington, v. 30, p. 7666-7672, 1991.

HARVEY, J.N.; JAFFA, A. A.; MARGOLIUS, H.S.; MAYFIELD, R.K. Renal kallikrein abnormalities of diabetic kidney. *Diabetes*, v. 39, p. 299-303, 1992.

HORNING, B.; DREXLER, H. Endothelial function and bradikinin in humans. *Drugs*, Auckland, v. 54. N. 5, p. 42-47, 1997. Supplement.

ISHIDA, T.; KATO, S. Role of Asp 102 in the Catalytic Relay System of Serine Proteases: A Theoretical Study. *Journal of American Chemical Society*, Washington, DC, v. 126, n. 22, p. 7111-7118, 2004.

JAFFA, A. A.; MILLER, D. H.; BAILEY, G.S.; CHAO, L.; MARGOLIUS, H.S.; MAYFIELD, R.K. Abnormal regulation of renal kallikrein in experimental diabetes. Effects of insulin on prokallikrein synthesis and activation. *Journal Clinical Invest*, v. 80, P. 1651-1659, 1987.

JAFFA, A. A.; DURAZO-ARVIZU, R., ZHENG, D.; LACKLAND, D. T.; SRIKANTH, S.; GARVEY, W. T.; SCHMAIER, A. H.; DCCT/EDICSTUDYGROUP. Plasma prekallikrein: a risk marker for hypertension and nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes* v. 52, p. 1215-1221 2003.

JOHNSON, A. M. Amino acids, peptides and proteins. In: BURITIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BURNS, D. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 4 ed. St. Louis: Elsevier Sanders, p. 533-595, 2006.

KATORI, M.; MAJIMA, M. Pivotal role of renal kallikrein-kinin system in the development of hypertension and approaches to new drugs based on this relationship. *Japanese Journal of Pharmacology*, Kyoto, v. 70, p. 95-128, 1996.

LAMB, E.; NEWMAN, D. J.; PRICE, C. P. Kidney function tests. In: BURITIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BURNS, D. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 4 ed. St. Louis: Elsevier Sanders, p. 795-835, 2006.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Biossinalização. *Lehninger Princípios de bioquímica*. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. Cap.13, p. 340-377.

LEVINSKY, N. G. The renal kallikrein-kinin system. *Circulation Research*, Baltimore, v. 44, n.4, p. 441-451, 1979.

MANTO, A.; COTRONEO, P.; PORCELLI, G.; ERRICO, G.D.; MARRA, G.; MAGNANI,P.; TILLI, P.; GRECO, A.V.; GHIRLANDA, G. Urinary kallikrein excretion in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, Berlin, v. 36, p. 423-427, 1993.

MARES-GUIA, M.; DINIZ, C. R. Kallikreins in glandular tissues. In: Erdos, E. G.; WILDE, A. F. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 1. Ed. Springer-Verlag Berlim. Heidelberg, p. 141-155, 1970.

MARGOLIUS, H. S. Tissue Kallikreins and kinins: regulation and roles in hypertensive and diabetic diseases. *Annual review of pharmacology and toxicology*, Palo Alto, v. 29, p. 343-64, 1989.

MARTINEZ, T. L. R. Metabolismo de lípidos e lipoproteínas. In: Martinez *et al.* *Manual das condutas clínicas nas dislipidemias*. Rio de Janeiro: Medline, 2003. Cap 1, p. 21-33.

MAYFIELD, R. K.; MARGOLIUS, H. S. Renal kallikrein-kinin system. *American Journal of Nephrology*, Basel, v 3. P. 145-155, 1983.

MAYFIELD, R. K.; MARGOLIUS, H. S.; LEVINE, J.H.; WOHLTMANN, H.J.; LOADHOLT, C.B.; COLWELL, J.A. Urinary kallikrein excretion in insulin-dependent diabetes mellitus and its relationship to glycemic control. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Baltimore, v. 59, p. 278-286, 1984.

MCDONALD, M.; PERKS, A. M. Plasma bradykininogen and reproductive cycles: studies during the oestrous cycle and pregnancy in the rat and in the human menstrual cycle. *Canadian Journal of Zoology*, Ottawa, v. 54, p. 941-947, 1976.

METZGER, B. E.; COUSTAN, D. R. Summary and Recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, vol.30, p. 251– 60, 2007.

MIRANDA, T. L. S.; RAMOS, C. H. I.; FREIRE, C. H. I. R.; SOUZA, E. P.; ROGANA, E. P. S.; SANTORO, M. M.; FIGUEIREDO, A. F. S. Kinetic mechanism of the inhibition of human urinary kallikrein by basic pancreatic trypsin inhibitor. *Brasilian Journal of Medical and Biological Research*, São Paulo, v. 28, p. 502-512, 1995.

MIRANDA, G. M.; Avaliação da atividade amidásica da calicreína tecidual humana na urina de indivíduos sadios e de pacientes com diabetes mellitus tipo 1. (*Mestrado em Ciências Farmacêuticas*) 98 f., Faculdade de Farmácia - UFMG, Belo Horizonte, 2007.

MORIWAKI, C.; FUJIMORI, H.; MORIYA, E. Studies on kallikrein IV. Enhancement of valine transport action the rat small intestine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, v. 25, p. 1174-1178, 1966.

MULLER-ESTERL, W.; RAUHT, G.; LOTTSCHEICH, F.; KELLERMANN, J.; HENSCHEN, A. Limited proteolysis of human low-molecular-mass kininogen by tissue kalikrein. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, v. 149, p. 15-22, 1985.

MULLER-ESTERL, W.; IWANAGA, S.; NAKANISHI, S. Kininogens revisited. *Trends in Biochemical Sciences*, Amsterdam, vol. 11, p. 336-339, 1986.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Aminoacids, peptides and proteins. In: NELSON, D. L.; COX, M.M. *Lehninger: principles of biochemistry*, 3 ed. New York: Worth Publishes, p.137, 2000.

NEME, BUSSÂMARA. Adaptação do organismo materno à gravidez. *Obstetrícia Básica*, 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2006. Cap. 6, p.36-44.

ÖHMAN, K. P. *The kallikrein system in primary hypertension dynamics of circulating components of the kallikrein-kinin system in relation to the renin-angiotensin-aldosterone system*. Linköping University Medical Dissertation, n. 529, 1997.

OUVIÑA, S. M.; GRECA, R. D.; ZANARD, N. L.; PALMER, L.; SASSETI, B. Endothelial dysfunction, nitric oxid and platelet activation in hypertensive and diabetic type II patients. *Thrombosis Research*, Elmsford, v. 102, n. 2, p. 107-114, 2001.

PELIKÁNOVÁ, T.; PINSKER, P.; SMRCKOVÁ, I.; STRIBRNÁ, L.; DRYÁKOVÁ, M. Decrease urinary kallikrein with hyperglycemia in patients with short-term insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications*, v. 12, p. 264-272, 1998.

PETERSON, G.L. Determination of total protein. *Methods in Enzimology*, v. 91, p. 95-119, 1983.

REGOLI, D.; BARABÉ, J. Kinin receptors. *Methods in Enzimology*, New York, v. 163, p. 210-230, 1988.

ROCHA, S. M, BERALDO, T. W, ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by tripsin. *American Journal of Physiology*, v. 156, p. 261-273, 1949.

SATIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, v. 414, P. 799-806, 2001.

SCHACHTER, M. Kallikrein (kinininogenases) – A group of serine proteases with bioregulatory actions. *Pharmacological Reviews*, Baltimore, v. 31. n.1, p. 1-17, 1980.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Orlando, v. 27, n. 2, p.157-162, 1967.

SCHREMMER-DANNINGER. E.; OFFNER, A.; SIEBECK, M.; ROSCHER, A.A. B1 bradykinin receptors and carboxypeptidase M are both upregulated in aorta of pigs after LPS infusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Orlando, v. 243, p. 246-252, 1998.

SCICLI, G. A.; CARRETERO, O. A. Renal kallikrein-kinin system. *Kidney Int.* v. 29, p. 120-130, 1986.

(SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES) – SBD. Diagnóstico e tratamento do diabetes gestacional. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/artigos>. Último acesso em 2009.

SOUSA, M.O; MIRANDA, T.L.S.; COSTA, E. B.; BITTAR, E. R.; SANTORO, M. M.; FIGUEIREDO, A. F. S. Linear competitive inhibition of human tissue kallikrein by 4-aminobenzamide and benzamide and linear mixed inhibition by 4-nitroaniline and aniline. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, São Paulo, v. 34, p. 35-44, 2001.

SOUSA, M.O; MIRANDA, T.L.S.; MAIA, C.N.; BITTAR, E.R.; SANTORO, M.M.; FIGUEIREDO, A.F.S. Kinetic peculiarities of human tissue kallikrein: 1- substrate activation in the catalyzed hydrolysis of H-D-Valyl-L-leucyl-L-arginine 4-nitroanilide and H-D-Valyl-L-leucyl-L-lysine 4-nitroanilide; 2 – substrate inhibition in the catalyzed hydrolysis of N α -p-Tosyl-L-arginine methyl ester. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, v. 400, p. 7-14, 2002.

SOUSA, M. O. Aspectos bioquímicos do diabetes mellitus. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, 2003. 34p. (Apostila didática do IV curso de aperfeiçoamento em análises clínicas).

TSCHOPE, C.; GAVRILUK, V.; REINECKE, A.; SEIDL, U.; RIESTER, U.; HILGENFELDT, U.; RITZ, E.; UNGER, T. Bradykinin excretion is increased in severely hyperglycemic streptozotocin-diabetic rats. *Immunopharmacology*, v. 33, p. 344-348, 1996.

UGLESITY, A.; KREISBERG, J.L.; LEVINE, L. Stimulation of arachidonic acid metabolism in rat kidney mesangial cells by bradykinin, antidiuretic hormone and their analogues. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 10, p. 83-93, 1983.

VAN DE WAL, R. M. A.; ASSELBERGS, F. W.; PLOKKER, H. W. T.; SMILDE, T. D. J.; LOK, D. J. A.; VELDHUISEN, D. J. VAN.; GILST, W. H. V.; VOORS, A.A. High prevalence of microalbuminuria in chronic heart failure patients. *Journal Cardiac Failures*, v.11, n.8, p. 602-606, 2005.

WEBSTER, M.E. Kallikrein in glandular tissue. In: ERDOS, E.G. (ED). Bradykinin, kalidin and kallikrein: Berlin: Springer-Verlag, 1970. P. 324-350. (Handbook of Experimental Pharmacology, 25).

(WORLD HEALTH ORGANIZATION) - WHO. Diabetes mellitus. *Fact sheets*, n. 138, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/inf-fs/en/fact138.html>>. Abril 2002. Último acesso em 2009.

YOUSEF, G.M.; CHANG, A.; SCORILAS, A.; DIAMANDIS, E. P. Genomic organization of the human kallikrein gene family on chromosome 19q13.3 – q13.4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 276, p. 125-133, 2000.

YOUSEF, G.M.; DIAMANDIS, E. P. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocrine Reviews*, v. 22, n. 2, p. 184-204, 2001.

YOUSEF, G.M.; DIAMANDIS, E. P. Human tissue kallikreins: a new enzymatic cascade pathway? *Biological Chemistry*, v. 383, n. 7-8, p. 1045-1057, 2002.

YOUSEF, G.M.; DIAMANDIS, E. P. An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: Emerging candidate tumor markers. *Clinical Biochemistry*, Toronto, v. 36, p. 443-452, 2003.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS**



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO:

- Avaliação da atividade amidásica da caliceína tecidual humana na urina de mulheres sadias e de pacientes com diabetes mellitus gestacional.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES:

- Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Faculdade de Farmácia da UFMG
- Centro de Especialidades Médicas Dario Faria Tavares - Santa Casa de Belo Horizonte e Ambulatório Borges da Costa – HC/UFMG

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

NOME DO PACIENTE: _____

SEXO: Masculino Feminino

DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___

ENDEREÇO: _____

BAIRRO: _____

CIDADE: _____ UF: _____

CEP: _____ TELEFONE: DDD () _____

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. COORDENADORES: Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho e Prof. Dr. Amintas Fabiano de Souza Figueiredo

MESTRANDA: Carolina Antunes Magalhães

UNIDADE DA UFMG: Faculdade de Farmácia

COLABORADORES: Dr. Antônio Ribeiro de Oliveira Júnior, Dra. Anelise Impelizeri Nogueira, Dr. Ricardo Barsaglini da Silva Leite e Dr. Paulo Augusto Carvalho Miranda

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

III – DESCRIÇÃO DO PROJETO E REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE SOBRE A PESQUISA, CONSIGNADO:

A pesquisa que você está sendo convidado a participar tem o objetivo de verificar se a atividade da calicreína tecidual humana, enzima envolvida na regulação da pressão sanguínea, encontra-se alterada na urina de pacientes com Diabetes Mellitus Gestacional. Nesta pesquisa cada participante deve responder a um questionário, que será aplicado pela equipe da pesquisa, e deve colher o jato médio de amostra aleatória de urina em frasco apropriado que será enviado ao Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG. Não há risco algum para você. O único desconforto será a coleta da urina, feita no Ambulatório Borges da Costa HC/UFMG ou no Ambulatório da Santa Casa de Belo Horizonte na época de sua revisão médica. Os resultados obtidos serão mantidos em sigilo e em poder dos pesquisadores e dos médicos, envolvidos com a pesquisa. Toda informação obtida nessa pesquisa será divulgada em eventos acadêmicos, congressos e revistas especializadas, não revelando a sua identidade, que é confidencial. Sua participação é totalmente voluntária e caso você não queira participar não haverá qualquer prejuízo no seu tratamento. Você

poderá solicitar à equipe o seu desligamento do estudo a qualquer momento. Caso você queira se informar de mais detalhes sobre a pesquisa agora ou no futuro, poderá entrar em contato com o Professor Amintas Fabiano de Souza Figueiredo (31) 3499-6897 ou com a aluna de mestrado Carolina Antunes Magalhães (31) 3426-3499 e até mesmo com o Comitê de Ética em pesquisa da UFMG (31) 3499-4592. É através desse tipo de pesquisa que esperamos poder aumentar o nosso conhecimento sobre o Diabetes Mellitus Gestacional, importante para melhor condução do tratamento e monitorização dos indivíduos. Sua participação poderá ajudar outras pessoas que tenham o Diabetes Mellitus Gestacional.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

- 1- Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para diminuir eventuais dúvidas;
- 2- Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo ao seu tratamento;
- 3- Salvaguarda da confidencialidade , sigilo e privacidade.

V – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo médico e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Belo Horizonte, ___/___/___

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do médico
(carimbo ou nome legível)